

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
MESTRADO EM IMPLANTODONTIA**

Daniel Kfoury Lopes

**BIOCOMPATIBILIDADE E INFLUÊNCIA NO
REPARO ÓSSEO DE RESINAS EXTRAÍDAS DE
PLANTAS DA FLORESTA AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia/Área de concentração em Implantodontia, Departamento de Odontologia do Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do título de Mestre em Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Rodrigues Filho.

Co-orientador: Prof. Dr. João César Zielak.

FLORIANÓPOLIS

2011

Zielak JC. Desenvolvimento de osso ovino particulado e avaliação comparativa in vivo do potencial osteopromotor aplicado à odontologia. Tese de Doutorado em Processos Biotecnológicos, UFPR, 2005.

http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Hymenaea_courbaril.htm. Accessed February ,2010

ABC, American Botanical Council database. Aloe. Health Ingredients.
<http://cms.herbalgram.org/healthyingredients/Aloe.html>. Accessed March 31, 2010.

<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2004/junho/bn.2004-11-25.1383596589/>. Accessed January, 2010

<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2002/setembro/bn.2004-11-25.4940352274/>. Accessed February 2011

www.Saude.gov.br/portal.saude.gov.br/portal/saude/08. Accessed March,2010

BIOCOMPATIBILIDADE E INFLUÊNCIA NO REPARO ÓSSEO DE RESINAS EXTRAÍDAS DE PLANTAS DA FLORESTA AMAZÔNICA

Daniel Kfourri Lopes

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Implantodontia.”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado.

Florianópolis, 01 de Março de 2011.

Prof, Dr. Ricardo de Souza Magini
Coordenador do Curso

Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1967; 24(5): 674-83.

Van de Putte KA, Urist MR. Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix. *Clin Orthop* 1965; 43: 257-270.

Vieira Junior, G. M, Souza, C. M. L. and Chaves, M. H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. *Química Nova* 2005; 28: 183–7.

Williams DF. Biodegradation of surgical polymers. *J Mater Sci* 1982; 17: 1233,.

Wixson SK, White WJ et. al. A comparison of Pentobarbital, Fentanyl- Droperdiol, Ketamine-Xylazine and Ketamine-Diazepam Anesthesia in Adult Male Rats. 1987; 37(6): 726-730.

Yasukawa K, Akihisa T, Oinuma H, Kasahara Y, Kimura Y, Yamanouchi S, et al. Inhibitory effect of di- and trihydroxy triterpenes from the flowers of compositae on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *Biol Pharm Bull* 1996;19:1329–31.

Yogalakshmi B, Viswanathan P, Anuradha CV. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology*. 2010 Feb 9;268(3):204-12.

Zielak JC, Peracetta LF, Nicastrì AL. Mesa cirúrgica para animais de laboratório em experimentação. *Anais da FeSBE* 2000, res. 34.045, p. 172.

leaves and resin of species of Protium. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005, March, 75.

Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999; 341: 738–746.

Stanford JW. Commission on dental materials, instruments, equipment and therapeutics. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int Dent J.* 1980; 30(2): 140-8.

Stanley HR. Biological evaluation of dental materials. *Int Dent J.* 1992; 42(1): 37-46.

Stubblebine W, Langenheim J. Estudos comparativos da variabilidade na composição da resina da folha entre árvore parental e progênie de espécies selecionadas de *Hymenaea*: comparação de populações Amazônicas com uma população do sudeste brasileiro. *Acta amazonica*, Manaus, v.10, n.2, 1980, p.293-309

Stutzle H, Hallfeldt K, Mandelkow H, Kessler S, Schweiberer L. Bone regeneration stimulated by bone substitute materials. *Orthopade* 1998; 27(2): 118-25.

Susunaga GS, Siani AC, Pizzolatti MG, Yunes RA, Delle Monache F.
Triterpenes from the resin Protium heptaphyllum. *Fitoterapia* 2001; 72:709– 11.

Takata T, Wang H, Miyauchi M. Migration of osteoblastic cells on various guided bone regeneration membranes. *Clinical Oral Implants Research.* 2001 Aug;12(4):332-8.

Quadros DS, Nunomura SM, Nunomura RC. Atividade antioxidante da espécie *Brosimum parinarioides*. 30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2007; 11: 233.

Redzić S, Hodzić N, Tuka M. Plant pigments (antioxidants) of medicinal plants *Malva silvestris* L. and *Malva moschata* L. (Malvaceae), Bosnian journal of basic medical sciences. 2005 May; 5(2):53-8.

Revilla, J. Plantas da Amazônia Oportunidades Econômicas e Sustentáveis. Ed. 2002, INPA e SEBRAE, Manaus-AM, pp.89-90, 283-284

Reynolds T, Dweck AC. Aloe vera leaf gel: a review update. *J Ethnopharmacol*. 1999; 68:3–37.

Ruiz AL, Kohn LK, Foglio MA, Lahoz JE, Faria AD, Carvalho JE. Atividade anticâncer in vitro de *Brosimum Parinarioides* Ducke SSP. *Parinarioides* sobre células tumorais humanas. *Planta Med*. 2006 Out; 80(1):56-9.

Salata LA, Hatton PV, Devlin AJ, Craig GT, Brook IM. In vitro and in vivo evaluation of e-PTFE and alkali-cellulose membranes for guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 2001 Feb; 12(1): 62-8.

Schellini SA, Zimmermann GP, Hoyama E, Pellizon CH, Padovani CR, Selva D. Polyethylene gel in the subcutaneous tissue of rats: histopathologic and systemic evaluation. *Orbit*. 2008; 27(3): 153-6.

Siani AC, Ramos MF, - Menezes de Lima O Jr, Ribeiro dos Santos R, Fernandez-Ferreira E. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the

Oliveira FA, Lima-Junior RC, Cordeiro WM, Vieira-Júnior GM, Chaves MH, Pentacyclic triterpenoids, alpha,beta-amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004 Aug; 78(4): 719-25.

Oliveira FA, Chaves MH, Almeida FR, Lima RC Jr, Protective effect of alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Journal Ethnopharmacol.* 2005 Apr 8; 98(1-2): 103-8.

Olsson B, Sliwkowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod.* 1981; 7(8):355-69.

Pernet, R. Phytochimie des Burseracees. *Lloydia* 35 1972; (3): 280–287.

Perry LC. An Evaluation of Acute Incisional Strength with Traumaseal Surgical Tissue Adhesive Wound Closure. Leonia, N.J. Dimensional Analysis Systems, Inc. 1995.

Plante G.E., VanItallie T.B. Opioids for cancer pain: the challenge of optimizing treatment. *Metabolism Clinical and Experimental* 2010; 59(1): 47–52.

Poindexter J. Selection for Nonbuoyant Mutants of *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology.* 1978 Sept; 114: 1141- 1145.

Poindexter JS. The *Caulobacters*: ubiquitous unusual bacteria. *Microbiol Rev* 1981; 45: 123-179.

AGRADECIMENTOS

Principalmente aos meus pais e irmãos, pelo amor, carinho, amizade, suporte, confiança, criação e investimento em meu futuro profissional. Sem este apoio de toda uma vida, eu nunca chegaria tão longe. Amo muito todos vocês.

Em especial ao professor Dr. Rubens Rodrigues Filho, que apesar de todas as dificuldades de execução do presente trabalho, não desistiu de minha orientação, depositando toda a sua confiança em que eu poderia finalizá-lo. Muito obrigado professor.

Aos professores do Centro de Estudo e Pesquisa em Implantes Dentários (CEPID): Antônio Carlos Cardoso e Marco Aurélio Biachini, muito importantes na minha formação em implantodontia, e também como professor.

Em especial ao professor Ricardo de Souza Magini, não só por todo seu conhecimento e sabedoria a mim transmitidos, mas também, pela amizade e apoio nos momentos difíceis. Sou muito grato à suas palavras de alento e incentivo.

Especialmente à colega do doutorado, professora Moira Pedroso Leão por conhecimentos transmitidos, coleguismo e ajuda a superar minhas dificuldades.

Em especial, à colega de mestrado, Pamela Ribas Andrade, pelo companheirismo, parceria e amizade.

Com carinho à Monique Freiburger e Rosana Brescovici, colegas de profissão, pós-graduação e amigas sinceras.

Às funcionárias do CEPID: Dolores Rossi, Gisela Mengaz e Mirian Faria, pela paciência e presteza a nós alunos.

Em especial a família Stolf, por todos os momentos extremamente agradáveis que tivemos a oportunidade de compartilhar, apoio e carinho a mim dispensados. Foi por um tempo minha segunda família, e mora no meu coração.

Especialmente ao professor Dr. João César Zielak, pela orientação, amizade e por me incentivar a muitos anos à pesquisa.

Em especial ao professor Dr. Allan Fernando Giovanini pelo incentivo, disponibilidade e conhecimento a mim transmitido.

À coordenadora do curso de Odontologia da Universidade Positivo, professora Maria da Graça Kfoury Lopes, por abrir-me as portas, permitindo a conclusão deste trabalho.

Aos funcionários da Universidade Positivo, fundamentais na execução de todas as etapas deste estudo.

Com respeito aos animais que são utilizados em estudos experimentais. Sem eles, o avanço das pesquisas na área de saúde humana seria inviável.

Lima-Júnior RC, Oliveira FA, Gurgel LA, Cavalcante IJ, Santos KA, Campos DA. Attenuation of visceral nociception by alpha- and beta-amyrin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice. *Planta Med.* 2006 Jan;72(1):34-9.

Lorenzi H, Matos F. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

MacGillivray TE, Fibrin selants and glue. *Journal of Cardiac Surgery* 2003 Nov/Dec; 18(6): 480-485.

Marek, CA, Amiss LR Jr, Morgan RF. Acute thrombogenic effects of fibrin sealant on microvascular anastomoses in a rat model, *Ann Plast Surg* 1998; 41: 415.

Martins JEC. *Plantas medicinais de uso na Amazônia*. 1989,2 ed., Belém – Pará: Cultural CEJUP; 107p.

Maw JL, Quinn JV, Wells GA. A prospective comparison of octylcyanoacrylate tissue adhesive and suture for the closure of head and neck incisions. *J. Otolaryngol*, 1997; 26: 26.

McLeod DE, Reyes E, Branch-Mays G. Treatment of multiple areas of gingival recession using a simple harvesting technique for autogenous connective tissue graft. *J Periodontol*. 2009 Oct; 80(10): 1680-7.

Neto CS. Características físico-químicas de um poliuretano derivado do óleo de mamona utilizado para implantes ósseos. [Dissertação (Doutorado)]. São Carlos, SP: Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 127, 1997.

Karolcek J, Hegyl E. Antibacterial and other biological effects of adhesive substances and of plaster and natural resins in experimental conditions in vivo and in vitro. *Bratisl Lek Listy*. 1954 May; 34(5): 484-96.

Kenney EB, Lekovic V, Han T, Carranza FA Jr, Dimitrijevic B. The use of a porous hydroxylapatite implant in periodontal defects. I. Clinical results after six months. *J Periodontol*. 1985 Feb; 56(2): 82-8.

Kfuri M Jr, Paccola CA, Chierice GO, Shimano AC. Comparação entre pinos absorvíveis de poliparadióxanona e de poliuretana da mamona na fixação de segmentos osteocondrais do fêmur distal de coelhos. *Rev Bras Ortop* 2001; 36: 125-131.

Kishore D, Kannam S. Double bond migration of eugenol to isoeugenol over as synthesized hidrocalcites and their modified forms. *Applied Catalysis A: General* 2004; 270: 227-235.

Küçükaksu DS, Akgül A, Çağlı K, Taşdemir O. Beneficial effect of BioGlue surgical adhesive in repair of iatrogenic aortic dissection. *Tex Heart Inst J*. 2000; 27(3): 307-8.

Le Cointe, P.. A Amazônia Brasileira: Árvores e Plantas Úteis. *Livraria Clássica* 1934: 63-64. Não aparece no texto

Le Maire SA, Schmittling ZC, Coselli JS, Undar A, Deady BA, Clubb FJ Jr, Fraser CD Jr. BioGlue surgical adhesive impairs aortic growth and causes anastomotic strictures. *Ann Thorac Surg*. 2002 May; 73(5): 1500-5; discussion 1506.

RESUMO

A necessidade de novas alternativas em materiais de uso clínico em odontologia, incentiva novas pesquisas à procura de produtos naturais biocompatíveis. A biodiversidade da região amazônica Brasileira possui um enorme potencial de fontes vegetais, para a obtenção de substâncias com ação terapêutica. O presente estudo demonstra modelos experimentais em ratos de teste subcutâneo de biocompatibilidade, e emprego em terapia de enxertia óssea de três extratos vegetais de árvores amazônicas e uma Mistura Adesiva, contendo os três extratos: Resina do Breu branco (*Protium heptaphyllum march*) (**RBB**); a resina do Jatobá (*Hymenaea courbaril L*) (**RJ**); o leite do Amapá-doce (*Brosimum Parinarioides Ducke*) (**LA**); e a Mistura Adesiva (**MA**). O teste de biocompatibilidade subcutâneo avaliou, em microscopia de luz, o tipo de infiltrado inflamatório induzido por cada substância, nos tempos de 3, 7 e 15 dias. Os melhores resultados foram observados no grupo (**RBB**), apresentando reação inflamatória discreta à sua implantação. Em seguida vieram (**MA**), (**RJ**) e (**LA**) respectivamente. O leite do Amapá se revelou a substância menos biocompatível, apresentando quadro inflamatório agudo intenso, em todos os tempos experimentais. Os testes de enxertia óssea avaliaram em 7 e 21 dias, também em microscopia de luz, a ação dos três extratos e a Mistura Adesiva, associados ao enxerto autógeno, em defeitos de 5 milímetros criados na calota craniana da calvária de ratos. A histomorfometria revelou que, em associação com osso autógeno, o extrato do Breu Branco associado com osso autógeno (**A+BB**) (851,7 µm) também foi capaz de produzir resultados ósseos satisfatórios, comparáveis ao grupo autógeno (**A**) (694,4 µm) ao final de 21 dias. A associação Mistura Adesiva + osso autógeno (**A+MA**) produziu resultados iniciais (7 dias)

surpreendentes (313,8 μm), atingindo quase 2 vezes a espessura óssea média do grupo (A) (174,8 μm), com resultados similares ao grupo (A+BB) em 21 dias. Também em 21 dias, a associação da resina do Jatobá com osso autógeno (A+J) (467,1 μm) obteve resultados inferiores ao grupo (A), mas superiores ao grupo controle (C) (226,8 μm), onde os defeitos foram preenchidos apenas por coágulo. O grupo (A+LA) (487,9 μm), a associação de leite do Amapá com osso autógeno, também apresentou resultados superiores ao grupo (C), ao final de 21 dias. Sugere-se que, apesar da necessidade de novas pesquisas, a Mistura Adesiva, assim como o Breu Branco (*Protium heptaphyllum march*), tem potencial terapêutico no reparo ósseo.

Palavras-Chave: Produtos naturais, Anti-inflamatório, Autógeno, Enxerto Ósseo.

Gosain AK, Valerie B. M.D. The Current Status of Tissue Glues: Part II. For Adhesion of Soft Tissues., *Nov Plastic & Reconstructive Surgery*. 2002; 110(6):1581-1584.

Gungry SR, Black KS, Izutani H. Sutureless coronary artery by pass with biologic glued anastomoses. Preliminary in vivo and in vitro results. *Thor Cardiovasc Surg* 2000; 120: 473-477.

Hasmeda M, Kweifio-Okai G, Macrides T, Polya GM. Selective inhibition of eukaryote protein kinases by anti-inflammatory triterpenoids. *Planta Medica* 1999; 65:14-8.

Holanda Pinto SA, Pinto LM, Cunha GM. Anti-inflammatory effect of alpha, beta-Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology*. 2008 Feb; 16(1): 48-52.

Holmes RE. Bone regeneration within a coralline hydroxyapatite implant. *Plast Reconstr Surg*. 1979 May; 63(5): 626-33.

Ignácio H, Mazzer N, Barbieri CH, Chierice GO. Utilização da poliuretana da mamona nas formas compacta e porosa no preenchimento de falha óssea: estudo experimental em cães. *Rev Bras Ortop* 2002; 43: 124-128.

Inal S, Yilmaz N, Nisbet C, Güvenç T. Biochemical and histopathological findings of N-butyl-2-cyanoacrylate in oral surgery: an experimental study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Dec; 102(6): 14-7.

Fernandes JM, Jatobá (*Hymenaea courbaril* L. – *Leguminosae, Caesalpinioideae*): Uso Medicinal, Cultivo e Contribuições para a espécie. Educação Ambiental em Ação, 2006 .

Flecknell PA. Post-operative analgesia in rabbits and rodents. *Lab. Anim.* 1991; 20(9): 34- 37.

Fowler JF Jr, Woolery-Lloyd H, Waldorf H, Saini R. Innovations in natural ingredients and their use in skin care. *J Drugs Dermatol.* 2010 Jun; 9(6): 72-81.

Gai JEM, Lima CF. Composição Inorgânica de Leite de Amapá (*Brosimum parinarioides*, *Brosimum potabile* e *Brosimum utile ovatifolium*). *32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.* 2009, 13: 144.

Galil, KA, Schofield ID, Wright, GZ. Effect of n-butyl-2-cyanoacrylate (histoacryl blue) on the healing of skin wounds. *J. Can. Dent. Assoc.* 1984; 50: 565.

Galuppo SC. Valorização do Piquiá (*Caryocar villosum*) e Amapá-doce (*Brosimum parinarioides*) para a Comunidade de Piquiatuba: Flona do Tapajós. 2004. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém.

Gonçalves RT, Lima RD, Abreu ACA, Jeffreys MF, Pereira Jr. OL, Nunez CV. Cuantificación de La actividad antioxidante de Coussapoa *Asperifolia magnifolia* (trécul) Akkermans & C.C. Berg (Cecropiaceae) Y *Brosimum parinarioides* ducque (Moraceae). *Revista Cubana de Farmacia* 2006; 40:72.

ABSTRACT

The need for new alternative materials in clinical dentistry, encourages further researches of natural products. It's well known that Brazilian Amazon biodiversity has enormous potential plant sources for obtaining therapeutic substances. Experimental studies in rats are commonly used for the initial tests of new substances biocompatibility. The present study demonstrates experimental models in rats of biocompatibility subcutaneous test, and the possible use in bone graft therapies of three plant extracts from tropical rainforest trees, and the Adhesive Mixture made by the extracts: the Breu Branco (*Protium heptaphyllum* march) resin (**RBB**), the Jatobá (*Hymenaea courbaril* L) resin (**RJ**), the Amapá-doce (*Brosimum Ducke Parinarioides*) extract (**LA**); and the Adhesive Mixture (**MA**). The subcutaneous test evaluated the biocompatibility through analysis of inflammatory infiltrate characteristics, caused by each substance, in light microscopy, on 3, 7 and 15 days. The best results were presented by (**RBB**), showing discrete inflammatory reaction by it's implantation, followed by (**MA**), (**RJ**) and (**LA**), respectively. The Amapá extract had less biocompatible scores compared to the other substances, showing intense acute inflammation in all experimental times. The bone graft test evaluated extracts and Adhesive Mixture bone healing action by light microscopy. The associations extracts- autograft were used filling 5 mm defects in rat calvaria, at 7 and 21 days. The histomorphometry revealed that, in combination with autograft, the Breu Branco extract (**A+BB**) (851,7 µm) was also able to produce satisfactory results in bone graft therapy, reaching comparable outcomes to autograft group (**A**) (694,4 µm) at the end of 21 days. The Adhesive Mixture – autograft association (**A+MA**) (313,8 µm), has produced impressive initial results (7 days) to nearly 2 times the group

(A) (174,8 µm) average bone thickness, getting similar outcome to group (A+BB) in 21 days. The Jatobá resin - autograft association (A+J) (467,1 µm) has showed lower bone thickness in comparison to group (A), but higher levels compared to control group (C) (226,8 µm), where the blood clot was used for bone defect filling. The group (A+LA) (487,9 µm), the Amapá extract - autograft association, also showed superior levels in comparison to group (C). It suggests that, despite the need for additional researches, the Adhesive Mixture, as the Breu Branco (*Protium heptaphyllum* march) resin, has potential use in dentistry.

Keywords: Natural products, Antinflammatory, Autologous, Bone Graft

Coutinho DF; Travassos LMA, Amaral FMM. Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Indian communities from Maranhão-Brazil. *Visão Acadêmica* 2002 Jan-Jun; 3(1): 7-12.

Currie LJ, Sharpe JR, Martin R. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: A review. *Plast Reconstr Surg* 2001; 108: 1713.

Djeraba A, Quere P. In vivo macrophage activation in chickens with Acemannan, a complex carbohydrate extracted from Aloe vera. *Int J Immunopharmacol.* 2000 May; 22(5):365-72.

do Rosário MM, Kangussu-Marcolino MM, do Amaral AE, Noletto GR, Petkowicz CL. Storage xyloglucans: Potent macrophages activators. *Chem Biol Interact.* 2011 Jan 15; 189(1-2):127-33.

Duke JA, Wain KK. *Medicinal Plants of the World*; http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Hymenaea_courbaril. Html. 2003.

Economides N, Kotsaki-Kovatsi VP, Pouloupoulos A, Kolokuris I, Rozos G, Shore R. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. *J Endod.* 1995 Mar; 21(3): 122-7.

Erasmi AW, Wohlschlager C. Inflammatory response after BioGlue application. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1025.

Buser D, Hoffmann B, Bernard JP, Lussi A, Mettler D, Schenk RK. Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. *Clin Oral Implants Res.* 1998 Jun; 9(3): 137-50.

Calafiore A, DiGiammarco G, Vitolla G. Aortic valve exposure through a combined right atrial- ascending aortic approach in redo cases. *Ann Thor Surg* 2002; 73: 318-319

Carranza Jr, F A. Glickman: Periodontia Clínica, 7ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992, p. 635-40.

Cartaxo SL, Souza MM, de Albuquerque UP. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2010 Sep 15; 131(2):326-42.

Castro HG, Oliveira LO, Barbosa LC, Ferreira FA. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. *Química nova* 2004; 27(1): 55-57.

Cintra LT, Bernabé PF, de Moraes IG, Gomes-Filho JE, Okamoto T, Consolaro A, Pinheiro TN. Evaluation of subcutaneous and alveolar implantation surgical sites in the study of the biological properties of root-end filling endodontic materials. *J Appl Oral Sci.* 2010 Jan-Feb; 18(1): 75-82.

Chao H, Amaepreet S. BioGlue: Albumin/Glutaraldehyde Sealant in Cardiac Surgery. *Journal of Cardiac Surgery* 2003 Nov/Dec; 18(6): 500-503.

Corrêa, P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. *Imprensa Nacional*, 1984, vol I. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, Brasil, p. 82.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tubos de polietileno preenchidos pelos materiais experimentais.....	38
Figura 2: Disposição das incisões no dorso do animal.....	39
Figura 3: Marcação dos limites dos defeitos ósseos na calvária do animal.....	42
Figura 4: Osso autógeno animal, adicionado à Mistura Adesiva.....	43
Figura 5: Defeitos ósseo preenchidos.....	44
Figura 6: Pontos médios de frequências relativas de neutrófilo.....	57
Figura 7: Pontos médios de frequências relativas de macrófagos.....	58
Figura 8: Pontos médios de frequências relativas de linfócitos.....	59
Figura 9: Pontos médios de frequências relativas de plasmócitos.....	60
Figura 10: Pontos médios de frequências relativas de áreas de edema.....	50
Figura 11: Pontos médios de frequências relativas de áreas de fibrose.....	61
Figura 12: Exemplos histológicos do teste de biocompatibilidade.....	63
Figura 13: Exemplos histológicos da aplicação dos extratos em enxertia óssea.....	65
Figura 14: Média \pm Desvio padrão dos valores máximos de tecido ósseo nos períodos de 7 e 21 dias.....	68
Figura 15: Média \pm Desvio padrão dos valores máximos de tecido conjuntivo nos períodos de 7 e 21 dias de.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos grupos experimentais (biocompatibilidade).....	37
Tabela 2: Descrição dos grupos experimentais (teste de enxertia óssea).....	40
Tabela 3: Classificação dos escores de contagem celular....	49
Tabela 4: Escores de todas as amostras no tempo de 3 dias.....	51
Tabela 5: Escores de todas as amostras no tempo de 7 dias.....	53
Tabela 6: Escores de todas as amostras no tempo de 15 dias.....	55
Tabela 7: Modas das variáveis das células inflamatórias....	56
Tabela 8: Média das variáveis de tecidos ósseo e conjuntivo.....	67

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Kader M, Berger JM, Slebodnick C, Hoch J, Malone S, Wisse JH, Werkhoven MC, Mamber S, Kingston DG. Isolation and absolute configuration of ent-Halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. *J. Nat. Prod.* 2002; 65: 11-15

Aragão GF, Carneiro LM, Junior AP, et al., A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006 Dec; 85(4): 827-34

Aragão GF, Cunha Pinheiro MC, Nogueira Bandeira P, Gomes Lemos TL, de Barros Viana GS, Analgesic and anti-inflammatory activities of the isomeric mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *J Herb Pharmacother.* 2007; 7(2): 31-47

Bertolucci SKV, Cappelle ER, Pinheiro RC. *Manipulação de fitoterápicos.* 2001, Lavras, MG: UFLA/FAEPE, 206p.

Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg* 1998; 9: 310-316.

Buckley RC, Breazeale EE, Edmond JA, Brezezienski, MA. A simple preparation of autologous fibrin glue for skin-graft fixation. *Plast Reconstr Surg* 1999; 103: 202.

7 CONCLUSÕES

De acordo com as informações anteriormente consideradas neste trabalho, pode-se concluir que:

O extrato mais biocompatível foi o Breu Branco (*Protium heptaphyllum march*), seguido pela Mistura Adesiva, Jatobá (*Hymenaea courbaril L*), e Leite do Amapá (*Brosimum Parinarioides Ducke*), respectivamente.

Ao final do tempo experimental (21 dias), os melhores resultados foram obtidos nas aplicações de osso autógeno isolado, associado com a resina do Breu Branco (*Protium heptaphyllum march*), e associado com a Mistura Adesiva, não havendo diferenças significativas do ponto de vista estatístico. No entanto, em 7 dias, a Mistura Adesiva acelerou significativamente o reparo ósseo primário.

LISTA DE SIGLAS

A	- Grupo Osso Autógeno
A+BB	- Grupo Osso Autógeno + Resina do Breu Branco
ABTS	- Teste de 3-etilbenzotiazoline-6-acido sulfônico
A+J	- Grupo Osso Autógeno + Resina do Jatobá
A+LA	- Grupo Osso Autógeno + Leite do Amapá
A+MA	- Grupo Osso Autógeno + Mistura Adesiva
AF	- Área de Fibrose
AM	- Área Medular
AN	- Área de Necrose
ART	- Área de Reparação Tecidual
BPA	- Partição por Acetato de Etila
BPD	- Partição por Diclorometano
C	- Grupo controle
CG	- Células Gigantes
DPPH	- Teste de 1,1-difenil-2-picrilidrazil
ETC	- Espessura de Tecido Conjuntivo
ETO	- Espessura de Tecido Ósseo
FOI	- Fragmento de Osso Imaturo

LA - Leite do Amapá
 MA - Mistura Adesiva
 PIA - Processo Inflamatório Agudo
 PIAC - Processo Inflamatório Agudo e Crônico
 PIC - Processo Inflamatório Crônico
 RBB - Resina do Breu Branco
 RJ - Resina do Jatobá
 TC - Tecido Conjuntivo
 TG - Tecido de Granulação
 TOC - Tecido Ósseo Compacto
 TOE - Tecido Ósseo Esponjoso

restantes diferiram. É interessante notar que de forma geral quanto mais tecido ósseo neoformado, menos tecido conjuntivo havia sobre este. Uma exceção pareceu acontecer no grupo (A+LA), que formou tanto osso quanto (A+J) em 21 dias, porém quase o dobro de quantidade de tecido conjuntivo (tabela 3). Novamente especula-se sobre a atividade intersticial prolongada do Leite do Amapá, e uma reação mais evidente do tecido onde foi inserido. Assim, novas pesquisas sobre o potencial de dissolução intersticial desta substância, além do estudo de técnicas de conservação e armazenamento, são necessárias.

Em um panorama mais amplo, o extrato do Breu Branco se apresentou como a substância componente da Mistura Adesiva mais biocompatível, e em associação com osso autógeno também foi capaz de produzir resultados ósseos satisfatórios. Por sua vez, a partir dos dados da tabela 3, pode-se observar que a Mistura Adesiva produziu resultados iniciais (7 dias) surpreendentes: a) atingindo quase 2 vezes a espessura óssea média do grupo autógeno, considerado padrão “ouro” dos enxertos atualmente utilizados; b) quase 3 vezes a espessura óssea média do grupo (A+J); c) 3 vezes a espessura óssea média do grupo (C); d) 3,5 vezes a espessura óssea média do grupo (A+BB); e e) 5 vezes a espessura óssea média do grupo (A+LA).

Logo, se por um lado a inexistência de literatura dificultou a discussão destes resultados, por outro, o atual trabalho passa a ser mais valorizado pelo seu pioneirismo e, portanto, apesar das suas limitações de análise crítica, através da comparação com pesquisas prévias, pode se tornar um ponto de partida essencial para futuras investigações sobre o potencial destes extratos vegetais em aplicações clínicas.

grupo onde apenas o coágulo foi mantido, em todo o período de monitoramento (tabela 3, gráfico 7).

O grupo Breu Branco associado ao enxerto autógeno, em 7 dias se comportou semelhantemente ao grupo coágulo, mostrando uma superioridade apenas em 21 dias. Porém, este tratamento ao final do tempo experimental, resultou em valores similares ao enxerto autógeno isolado (tabela 3, gráfico 7). Agora, no quesito qualitativo, pode-se observar nas figuras 7H e 7D que o resultado final da ossificação aparenta ter um padrão mais favorável, com osso compacto haversiano.

O grupo no qual foi aplicada a associação de osso autógeno e Leite do Amapá, inicialmente não demonstrou diferenças significativas com o grupo coágulo, apesar de demonstrar valores inferiores ao osso autógeno. Em 21 dias, este grupo proporcionou resultado semelhante ao grupo da associação autógeno-resina do Jatobá, inferior ao grupo autógeno isolado (tabela 3, gráfico 7). Sobre a qualidade óssea, os resultados deste grupo foram inferiores a todos os outros (fig. 7). Esta ocorrência pode ser explicada pelos resultados anteriores de biocompatibilidade que demonstraram uma ação prolongada da substância em tecidos vivos, o que pode ter contribuído negativamente para o reparo ósseo. Ainda assim, em 21 dias, apresentou padrão mais adiantado de ossificação do que o grupo coágulo.

Finalmente, a análise do grupo onde a Mistura Adesiva foi associada ao osso autógeno, demonstrou em 7 dias o início mais rápido do processo de neoformação óssea, superando o grupo autógeno significativamente (A+MA= 313,8; A= 174,8; tabela 3). Já no período de 21 dias houve equiparação dos valores entre os grupos (A), (A+BB) e (A+MA). O aspecto qualitativo mostrou características semelhantes entre os grupos (A+MA) e (A) (fig. 7L e 7D).

Considerando as medidas de tecido conjuntivo obtidas, todos os grupos foram semelhantes no período de 7 dias. Já em 21 dias, apenas os grupos (A) e (A+MA) demonstraram padrão semelhantes, sendo que todos os

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 MANOBRAS AUXILIARES DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CIRURGICAS.....	19
2.2 TERAPÊUTICA COM EXTRATOS VEGETAIS	21
2.3 EXTRATOS VEGETAIS NA TERAPIA DE ENXERTIA ÓSSEA.....	24
2.4 PLANTAS AMAZÔNICAS E RESPECTIVOS EXTRATOS (RESINA).....	28
2.4.1 <i>Protium heptaphyllum march</i>	28
2.4.2 <i>Hymenaea courbaril L</i>	31
2.4.3 <i>Brosimum Parinarioides Ducke</i>	32
3 OBJETIVOS.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS.....	35
4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	36
4.2.1 Teste de biocompatibilidade subcutâneo.....	36
4.2.2 Teste de aplicação em enxertia óssea.....	39
4.3 EUTANÁSIA.....	44
4.4 TÉCNICA HISTOLÓGICA.....	44
4.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	47
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5 RESULTADOS.....	50

5.1	TESTE DE BIOCOMPATIBILIDADE.....	50
5.2	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	65
6	DISCUSSÃO.....	70
7	CONCLUSÕES.....	76
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

inflamatórios agudo e crônico simultaneamente (fig. 6D, 6E, 6F), além disto, os achados deste trabalho sugerem que ação intersticial desta substância é prolongada e constante. Mesmo assim, a reação de edema se dissipa em 15 dias (gráfico 6).

Inicialmente a Mistura Adesiva apresentou quantidade moderada de neutrófilos, característica que pode ter sido influenciada pela presença do Leite do Amapá em sua composição (tabela 7, gráfico 1, fig. 6J). No entanto, ao longo do tempo, notou-se uma diminuição no quadro inflamatório agudo (fig. 6K, 6L), o que pode sugerir efeitos antagônicos entre os componentes da mistura, ou seja, um extrato pode inativar a ação de outro. Em relação à atividade macrofágica, foi caracterizada como sendo muito baixa (gráfico 2). Em contrapartida, o quadro inflamatório crônico é constante e semelhante ao Leite do Amapá (gráficos 3 e 4), sendo que foi o único grupo que apresentou aumento no quadro de edema em 15 (gráfico 5). Ao final de 15 dias, as características de biocompatibilidade podem ser classificadas como semelhantes ao Breu Branco (fig. 6I, 6L).

Em relação ao emprego dos extratos em enxertia, associação da resina do Jatobá com osso autólogo, inicialmente (7 dias) se mostrou semelhante ao uso do osso autólogo isolado no que diz respeito as espessuras máximas de tecido ósseo neoformado (tabela 3, gráfico 7). No entanto, ao observar a figura 7 (7C e 7E), percebe-se que as qualidades do tecido mineral entre os dois tratamentos são diferentes. Deve-se ressaltar que, no presente estudo, a morfometria considerou apenas a medida, tanto de tecido duro (tecido ósseo) quanto de tecido mole (tecido conjuntivo), não caracterizando a qualidade ou estágio da ossificação. Uma vez que, a figura 7C demonstra osso com áreas medulares em estágio de ossificação mais avançado do que a figura 7E (áreas de reparo tecidual). Em 21 dias, o estágio de ossificação deste grupo mostrou-se menos significativamente avançado do que osso autólogo. Mesmo assim, exibiu padrão de ossificação mais favorável do que o

2005). A exemplo de nossa análise, que também detectou um baixo número de neutrófilos (1-25%) no tempo experimental de 3 dias (fig. 6- G), considerado como sendo um período onde o processo inflamatório agudo começa a se tornar crônico. Em 7 e 15 dias, o número de neutrófilos reduziu ainda mais (0-1%) (fig. 6- H / I), já exibindo características teciduais de reparo, ou seja, uma característica de inflamação crônica, de intensidade discreta (fig. 6- I). O baixo número de neutrófilos (tabela 7, gráfico 1) possivelmente se deve a ação antimicrobiana da substância (Sussunaga et al. 2001). Este efeito antiinflamatório também tem ação positiva sobre células do periodonto de ratos, podendo ser usada em terapias periodontais em humanos (Holanda-Pinto et al., 2008), justificando seu interesse para a Odontologia. Um fato que chama a atenção é o número insignificante de células macrofágicas (tabela 7, gráfico 2), baixa presença de linfócitos, plasmócitos e edema (gráficos 3, 4 e 5), o que demonstra a grande biocompatibilidade deste extrato vegetal.

Em relação ao Leite do Amapá, o fato que se destaca é a presença intensa de neutrófilos em todos os tempos experimentais (tabela 7, gráfico 1, fig. 6-D / E / F), o que parece estar em contra-senso com a literatura que o classifica como uma substância anti-inflamatória, cicatrizante (Embrapa, 2004; Quadros et al., 2007). Porém, é importante ressaltar que o Leite do Amapá é perecível (Embrapa, 2002), o que pode ter comprometido sua reação tecidual (necrose- fig. 6F), uma vez que, desde a coleta até seu uso no experimento, tempo e distâncias podem ter contribuído para a alteração do estado de conservação deste extrato. A atividade macrofágica se revelou alta inicialmente, com diminuição gradativa (7 dias), e estabilização em 15 dias (gráfico 2). Assim como os neutrófilos, a atividade de linfócitos e plasmócitos foi constante, mas em nível inferior (gráficos 3 e 4) – o que o caracteriza como uma substância que estimula quadros

1 INTRODUÇÃO

A partir de propriedades terapêuticas relatadas pela sabedoria popular, muitas substâncias naturais tem sido estudadas a fim de se conhecer alguns mecanismos teciduais que possam verdadeiramente justificar seu uso em saúde. Várias destas substâncias são usadas como cicatrizantes tópicos em ferimentos, sugerindo atividade antimicrobiana e antiinflamatória, podendo acelerar os processos de reparo tecidual.

Testes de biocompatibilidade são primordiais no estudo de novas substâncias, uma vez que é necessário se conhecer a reação tecidual inicial do contato destas com o meio orgânico interno.

Atualmente, a fim de se obter os melhores resultados com o mínimo de desconforto, o estudo das substâncias naturais com propriedades cicatrizantes pode resultar em uma nova opção de aplicação clínica, auxiliando também na agregação de valor a matérias-primas locais nacionais.

Tanto na Medicina quanto na Odontologia, uma das possíveis aplicações pode ser no tecido ósseo, com intuito de otimizar técnicas de enxertia que visem o restabelecimento da função bem como da estética. Do osso dependem posturas, movimentos, e até a colocação de implantes dentários, por exemplo – características importantes à qualidade de vida de um indivíduo. Sabe-se da existência de inúmeras alternativas, de diferentes procedências, utilizadas para enxertia, que possam favorecer de alguma forma a qualidade e também a velocidade do processo de reparo. Além disso, observa-se também a procura e a necessidade do desenvolvimento de adesivos biocompatíveis.

O Brasil é um país com imensa biodiversidade e, portanto, possui inúmeras fontes de recursos naturais de potencial inexplorado. O objetivo deste trabalho foi

pesquisar um pouco sobre alguns extratos naturais da Amazônia, de sabedoria popular, que podem (potencialmente) desempenhar funções favoráveis aos procedimentos de engenharia tecidual, voltados para aplicações práticas em feridas cirúrgicas e de reparo ósseo.

O texto a seguir aborda assuntos como manobras auxiliares de cicatrização de feridas cirúrgicas, o uso popular de extratos vegetais em saúde e o emprego na enxertia óssea. Para o desenvolvimento experimental, três extratos vegetais amazônicos foram escolhidos e submetidos a testes de biocompatibilidade e de reparo ósseo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MANOBRAS AUXILIARES DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CIRÚRGICAS

Por muito tempo, as técnicas de suturas foram o modo mais comumente usado para propiciar um fechamento adequado de feridas cirúrgicas, ou para o posicionamento e imobilização de porções de tecidos moles transplantados a serem fixados na área receptora (McLeod et al., 2009). Para tal, existe uma gama de fios que podem ser utilizados nas mais diversas técnicas, dependendo da necessidade do procedimento. Entretanto, apesar da variedade de materiais disponíveis, as técnicas de sutura estarão sempre sujeitas a falhas, portanto susceptíveis a complicações pós-cirúrgicas, como as infecções (Gosain et al., 2002). São comuns intercorrências como o afrouxamento dos pontos ou a completa soltura dos mesmos, causando deiscência tecidual pós-cirúrgica, e consequentemente o atraso do período de cicatrização (Singer, 1997). Sendo assim, conclui-se que o método ideal para o fechamento de feridas tem de ser ao mesmo tempo simples, rápido, barato, e principalmente, prevenir contra infecções (Gosain et al., 2002).

substâncias, apesar dos relatos de utilização empírica das mesmas por humanos. Há também a vantagem de serem animais pequenos, de fácil manuseio, e com uma reação tecidual rápida (Zielak, 2005).

Quanto à aplicação em enxertia, percebeu-se que havia necessidade de um veículo condutor para os extratos vegetais. Por este motivo, optou-se pelo uso em associação com osso autógeno.

A resina do Jatobá mostrou um padrão de infiltrado neutrofílico que aumentou com o passar do tempo (gráfico 1). Inicialmente, demonstrou a ativação de células macrofágicas (tabela 7, gráfico 2), observação que está em acordo com outro estudo recente (do Rosario et al., 2011), no entanto é importante salientar que são condições experimentais diferentes, sendo que, no presente estudo, a substância foi utilizada em uma situação de trauma cirúrgico. O número de linfócitos e plasmócitos (gráficos 3 e 4) foi grande se comparado aos outros grupos envolvidos no experimento (fig. 6- A / B / C). O edema inicial foi grande em 3 dias, com desaparecimento em 7 dias (gráfico 5).

A resina do Breu Branco é o componente da Mistura Adesiva com mais pesquisas realizadas para elucidar seu mecanismo de ação. A substância α e β -amyrin, isolada da resina do Breu Branco, é conhecida como o principal princípio ativo, responsável por muitas ações terapêuticas previamente relatadas (Susunaga et al., 2001). Testes *in vivo* previamente realizados revelaram, além de outras atividades, uma ação de inibição na produção de células inflamatórias (Oliveira et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Siani et al., 2005; Aragão et al., 2006; Lima-Júnior et al., 2006; Aragão et al., 2007; Holanda Pinto et al., 2008). Tal ação foi comprovada pelo estudo que avaliou a atividade de óleos essenciais provenientes do *Protium*, em ratos com inflamação pleural induzida. A análise em 24 horas revelou um decréscimo no número de células neutrofílicas e eosinófilos, em comparação ao grupo controle, sugerindo que houve uma grande inibição do quadro inflamatório agudo (Siani et al.,

6 DISCUSSÃO

O uso de tubos de polietileno no teste subcutâneo de biocompatibilidade é bem consagrado na avaliação *in vivo* de novas substâncias, com potencial utilização terapêutica em humanos (Torneck, 1967; Stanford, 1980; Stanley, 1992). Este polímero possui uma característica bioinerte, ou biocompatível, possibilitando seu uso como um carregador para substâncias, em testes de citotoxicidade (Cintra et al., 2010). Uma avaliação histológica demonstrou a atividade inflamatória discreta, em reação a injeção subcutânea do gel de polietileno em ratos, atestando sua compatibilidade e mínima irritabilidade a tecidos vivos (Schellini et al., 2008). Foram observadas também áreas de fibrose ao redor da região onde o material foi injetado, a exemplo da análise histológica realizada neste estudo (tabela 7, gráfico 6), o que pode ter influenciado a avaliação da maior ou menor capacidade de induzir fibrose das substâncias testadas uma vez que, com exceção do Leite do Amapá, todas as amostras atingiram os mesmos níveis de fibrose. Em nosso estudo foi constatada a presença de um tecido migrante ao interior dos tubos em alguns grupos (Torneck et al., 1967).

Uma possibilidade de falha na metodologia empregada com influência nos resultados obtidos esta relacionada ao diâmetro do tubo de polietileno, que não deve permitir o extravasamento do material para o meio tecidual. A medida ideal de diâmetro deve ser suficiente para o não extravasamento da substância, mas não deve influenciar a análise tecidual na saída dos tubos (Economides et al., 1995), sendo 1,2 milímetros é uma medida razoável. Outro aspecto importante, que ajuda a prevenir este tipo de falha é o selamento de uma das extremidades dos tubos (Olsson et al., 1981), realizado por nós com porções de polietileno compatíveis com a abertura.

A decisão de utilização de ratos para os estudos, além de serem usados em inúmeras pesquisas, foi também devido serem estes experimentos preliminares destas

Atualmente, com os avanços da tecnologia, já podemos contar com materiais adesivos eficientes, que foram criados para auxiliar cirurgiões em fechamento de diversos tipos de feridas, em diferentes tecidos (MacGillivray et al., 2003). Este tipo de material diminui o tempo cirúrgico e reduz as chances de falhas no fechamento de feridas.

Os primeiros relatos em literatura científica sobre a utilização de biomateriais que poderiam auxiliar no processo de cicatrização tecidual datam da metade do século passado. O primeiro relato da busca de materiais que auxiliassem no reparo de feridas, data do ano de 1954 (Karolcek, 1954). Clinicamente, os primeiros adesivos para tecidos vivos utilizados foram os derivados do cianoacrilato, como o Butil-2-cianoacrilato. Um estudo experimental em ratos avaliou a viabilidade do uso de adesivo à base de N-Butil-2-cianoacrilato em cirurgias bucais. Outro estudo demonstrou por meio de avaliações sanguíneas periódicas que após a aplicação do adesivo, em incisões na mucosa bucal dos animais, não houve resposta sanguínea imunológica de rejeição ao material (Inal et al., 2006). Outra pesquisa *in vivo* (Galil et al., 1984) comparou histologicamente a cicatrização de incisões cutâneas em *hamsters*, que foram fechadas através de sutura convencional com fio de sutura 4.0 com aquelas em que se utilizou o adesivo à base de Butil-2-cianoacrilato. A análise em 21 dias revelou um quadro cicatricial mais favorável ao grupo que recebeu a sutura convencional. Este fato levantou a questão da possível citotoxicidade do adesivo, mesmo tendo-se tomado o cuidado de evitar o contato direto com a parte interna da ferida. Outra pesquisa (Perry et al., 1995) com um material à base de 2-octil-cianoacrilato, revelou diminuição da citotoxicidade e da falta de flexibilidade no uso do Butil-2-cianoacrilato, fato que causava abertura do ferimento. Este derivado do cianoacrilato possui mais resistência, tendo quatro vezes mais flexibilidade se comparado ao adesivo de Butil-2-cianoacrilato (Perry et al., 1995). Também possui a

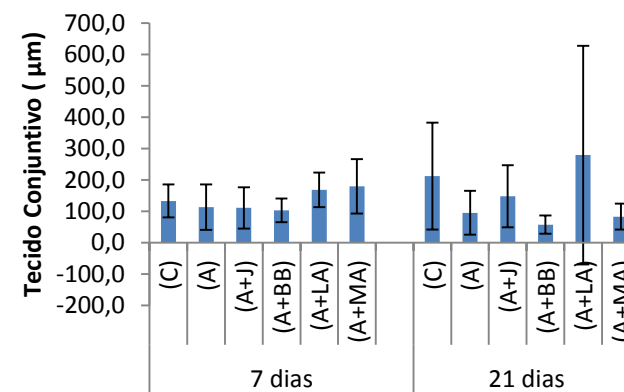
vantagem de ser absorvido pelo organismo em aproximadamente 10 dias. Um estudo que comparou o uso de 2-octil-cianoacrilato (Dermabond®) com o fechamento tradicional de feridas por sutura, em humanos, revelou que o emprego do material acelerou o processo de cicatrização, além de ser um tratamento menos doloroso ao paciente (Maw et al., 1997).

Outro adesivo para tecido utilizado clinicamente é a cola à base de fibrina. É basicamente constituída de componentes do plasma no estágio final de coagulação (uma mistura rica em fibrinogênio, e outra rica em trombina, adicionados ao fator XIII de coagulação sanguínea) (Marek et al., 1998). Com a mistura destes componentes ocorre a formação de monômeros de fibrina, que rapidamente se transformam em um coágulo formado por uma “rede” de fibrina. Eficiente no tratamento de feridas cirúrgicas, os adesivos de fibrina ressurgiram como aliados em cirurgias cardíacas, atuando como ferramenta para auxiliar em processos de hemostasia (MacGillivray et al., 2003). Pode ser obtida comercialmente, com produtos de origem bovina, em laboratório, ou ainda em consultório, utilizando o sangue do próprio paciente (Currie et al., 2001), do qual o plasma é extraído para a confecção do adesivo. Existem muitas formas de extração, mas o método com melhores resultados é o de precipitação por etanol, com maiores concentrações de fibrinogênio obtidas (Buckley et al., 1999). Este é um método mais seguro de utilização, já que a organização de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América é relutante em aprovar trombina de origem bovina, devido à possibilidade de propagação de infecções por patógenos provenientes dos animais (Marek et al., 1998).

Um selante tissular que é utilizado como auxiliar ou substituto de métodos tradicionais de sutura é o BioGlue. Sua composição é basicamente glutaraldeído a 10% adicionado a albumina a 45%, misturados em seringa misturadora (Chao et al., 2003). A medicina é a principal área de uso deste material, com a maioria dos relatos de

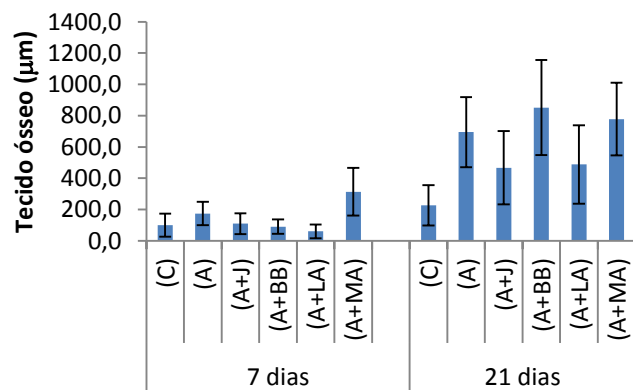
Nenhum dos grupos apresentou diferença entre as suas médias quando comparados os períodos de 7 e 21 dias ($p>0,05$). Todavia, ao comparar os grupos apenas no período de 21 dias, foi possível verificar que o grupo submetido ao (A+LA) apresentou uma média significativamente maior a todos os grupos, com exceção dos grupos (C) e (A+J). Porém, vale ressaltar que a variabilidade deste grupo foi bastante alta, podendo assim influenciar neste resultado. Além desta diferença, também foi possível verificar que o grupo submetido ao (A+BB) apresentou uma média significativamente menor que o grupo (C) ($p<0,05$). As demais comparações foram consideradas equivalentes entre si ($p>0,05$) (fig. 8).

Figura 15 – Média \pm Desvio padrão dos valores máximos de tecido conjuntivo dos grupos controle e experimentais nos períodos de 7 e 21 dias de experimentação.



Já no período de 21 dias, houve um aumento significativo de todos os grupos ($F_{5,60} = 4,14$; $p < 0,05$), com exceção do grupo (C), que manteve médias equivalentes nos dois períodos ($p > 0,05$). Em 21 dias, os grupos (A), (A+BB) e (A+MA) apresentaram médias equivalentes ($p > 0,05$), e significativamente maiores que os demais grupos ($p < 0,05$). Os grupos (A+J) e (A+LA) apresentam médias equivalentes entre si ($p > 0,05$), e diferentes em relação aos demais ($p < 0,05$), contudo foram considerados valores intermediários. O grupo (C) apresentou a menor média, sendo considerada significativamente diferente dos demais grupos ($p < 0,05$) (fig. 7).

Figura 14 – Média \pm Desvio padrão dos valores máximos de tecido ósseo dos grupos controle e experimentais nos períodos de 7 e 21 dias de experimentação.



Sobre a variável Tecido Conjuntivo, foi possível verificar que nos primeiros 7 dias de experimentação não houve diferenças significativas entre os grupos analisados ($F_{5,60} = 1,16$; $p > 0,05$). Contudo, na avaliação do período de 21 dias foram observadas algumas alterações significativas, descritas a seguir.

utilização em cirurgias torácicas em geral, principalmente em cirurgias coronarianas (Chao et al., 2003; Küçükaksu et al., 2000; LeMaire et al., 2002).

Um estudo experimental com o adesivo de albumina/glutaraldeído em suínos avaliou a ação do material na anastomose coronariana. Os resultados da avaliação histológica mostraram ótima biocompatibilidade e adesividade, apresentando uma característica tecidual de reparo em 1 semana, com reação inflamatória mínima em três semanas (Gungry et al., 2000). Em contra partida, estudos levantam a questão da toxicidade do material: dois trabalhos clínicos relataram que pacientes submetidos ao uso do adesivo em cirurgias cardíacas retornaram à mesa cirúrgica para nova intervenção. O resultado da biópsia revelou áreas de fibrose onde a cola foi aplicada, com presença de células macrofágicas (Calafiori et al., 2002; Erasmi et al., 2002).

2.2 TERAPÊUTICA COM EXTRATOS VEGETAIS

Os produtos provenientes de plantas, desde os primórdios da medicina terapêutica, contribuíram para o desenvolvimento de novas substâncias medicamentosas. O conhecimento inicial de certos extratos vegetais, geralmente é proveniente de habitantes antigos de uma região (Coutinho et al., 2002). Pelo do convívio com a natureza, gerações passadas destes povos obtiveram conhecimento e experiência, sabendo exatamente que tipo de extrato de planta utilizar para cada tipo de enfermidade ou lesão (Le Cointe, 1934).

A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2008) estima que 80% da população mundial depende ou faz uso de algum tipo de medicina tradicional natural, para suas necessidades patológicas. Cerca de 90% da população utiliza algum produto terapêutico de plantas, seus extratos vegetais, ou seus princípios ativos na composição de fórmulas de medicamentos industrializados.

Um exemplo da contribuição de produtos naturais para a área da farmacologia é a utilização do ópio na confecção de medicamentos como a morfina. Este opiáceo natural é um alcalóide com efeito narcótico e analgésico, de fundamental importância no tratamento de pacientes com cânceres invasivos, ou no tratamento de qualquer quadro de dor severa provocado por lesões graves. Esta substância tem utilização milenar e foi descoberta pelos povos mais antigos do oriente (Plante, 2010).

No Brasil, em várias regiões, os povos indígenas são responsáveis por boa parte das descobertas no campo da medicina natural, em especial na região da floresta Amazônica, a mais rica em biodiversidade do planeta (Revilla, 2002).

A sabedoria dos índios nos permitiu conhecer a indicação de muitas plantas com potencial utilização na confecção de produtos terapêuticos (Coutinho et al., 2002). Atualmente, existem mais de 25 mil espécies de árvores amazônicas catalogadas com potencial terapêutico comprovado cientificamente. As plantas medicinais são alternativas terapêuticas viáveis, especialmente entre as comunidades rurais, que não têm acesso a remédios da medicina alopática. Para gerações mais antigas, os derivados naturais de plantas representam uma fonte de medicamento, tornando-se de fundamental importância também na medicina moderna. Na Amazônia já existem algumas empresas manipuladoras e produtoras de remédios à base de ervas naturais (Embrapa, 2004).

Na odontologia, o emprego de produtos naturais em terapias é uma prática conhecida. Muitos fitoterápicos são utilizados há milênios no tratamento de enfermidades da cavidade bucal, principalmente na redução de um quadro doloroso. Em um dos primeiros relatos de plantas utilizadas para diminuir dores de dente estão os de indígenas que mascavam fumo (Coutinho et al., 2002). Um bom exemplo de um fitoterápico largamente utilizado em odontologia é a malva, como é popularmente conhecida. A *Malva sylvestris*

Tabela 8 – Médias e Desvio Padrão das variáveis tecido ósseo e tecido conjuntivo dos grupos analisados em função do tempo de 7 e 21 dias de experimentação. Significância estatística do teste ANOVA-fator duplo e LSD.

		Tecido Ósseo (µm)			Tecido Conjuntivo (µm)		
		Média	DP	Sig.*	Média	DP	Sig.*
7 dias	(C)	100,2	74,4	a	132,6	52,5	a
	(A)	174,8	74,5	ab	113,0	72,3	a
	(A+J)	110,2	66,2	ab	110,4	65,8	a
	(A+BB)	90,6	46,5	a	102,9	38,1	a
	(A+LA)	61,2	44,1	a	168,1	55,0	a
	(A+MA)	313,8	152,6	b	179,4	86,7	a
21 dias	(C)	226,8	128,7	a	211,9	170,4	ac
	(A)	694,4	223,5	b	94,6	69,9	ab
	(A+J)	467,1	234,9	c	147,8	99,0	abc
	(A+BB)	851,7	304,3	b	57,2	28,9	b
	(A+LA)	487,9	251,1	c	278,9	348,5	c
	(A+MA)	777,7	232,4	b	82,7	41,4	ab

* significância estatística: letras diferentes conferem a diferença entre os grupos

Foi possível verificar que no período de 7 dias, a variável Tecido ósseo manteve-se praticamente equivalente em todos os grupos, com exceção do grupo experimental **(A+MA)** que apresentou média significativamente maior quando comparada aos grupos controle, **(A+BB)** e **(A+LA)** ($F_{5,60} = 4,14$; $p < 0,05$).

Figura 13 – **A:** área de reparo tecidual (ART) sobre tecido ósseo compacto (TOC) remanescente (magnificação original 40 ×). **B:** tecido conjuntivo (TC) com processo de ossificação (40 ×). **C:** áreas medulares (AM) em região de enxertia com osso autógeno (100 ×). **D:** tecido ósseo esponjoso (TOE) e tecido ósseo compacto (TOC) em região de reparo (100 ×). **E:** área de reparo tecidual com formação em região de defeito (40 ×). **F:** fragmento de osso imaturo (FOI) coberto por tecido conjuntivo (400 ×). **G:** área de reparo ósseo tecidual (ART) com extensa ossificação (100 ×). **H:** tecido ósseo compacto (TOC) com características haversianas (400 ×). **I:** extensa área de tecido conjuntivo (TC) sobre tecido ósseo compacto (TOC) remanescente (40 ×). **J:** tecido conjuntivo (TC) sobre tecido ósseo compacto remanescente (40 ×). **K:** área de reparo tecidual (ART) sobre tecido ósseo compacto (TOC) remanescente (40 ×). **L:** áreas de tecido ósseo compacto (TOC) e tecido ósseo esponjoso (TOE) na região do defeito (100 ×). C= controle; A= autógeno; A+RJ= autógeno + Resina do Jatobá; A+LA= autógeno + Leite do Amapá; A+BB= autógeno + Resina do Breu Branco; A+MA= autógeno + Mistura Adesiva.

Em relação à análise das variáveis Tecido Ósseo e Conjuntivo, as estatísticas descritivas e suas significâncias podem ser observadas na tabela 3.

é um antiinflamatório natural, muito usado por pacientes, principalmente em áreas rurais, no tratamento de afecções em boca, na forma de colutório bucal. Um estudo recente submeteu a planta a cromatografia e espectrofotometria com intuito de fazer análises qualitativas e quantitativas, respectivamente. Confirmou-se o potencial fito-medicinal pelo mapeamento estrutural de moléculas de terpenos presentes nos compostos do extrato da planta (Redzić et al., 2005).

No setor industrial de materiais odontológicos, a utilização de produtos naturais também é bem difundida. Um exemplo de produto natural muito utilizado na composição de materiais odontológicos é o eugenol. Extraído do óleo do cravo-da-índia, é usado há muito tempo devido às suas propriedades anestésicas e antibacterianas locais, que provêm desse óleo volátil, caracterizado como sendo um composto fenólico. Uma das propriedades atribuídas ao eugenol é o alívio do quadro de dor pulpar. O principal mecanismo de ação desta substância é a capacidade de bloqueio parcial de estímulos nervosos. Exerce uma atividade de bloqueio do impulso de condução nervosa que, em baixas concentrações, é capaz de reduzir a transmissão sináptica neuromuscular, inibindo a síntese das prostaglandinas (Kishore et al, 2004). Uma pesquisa investigou a ação preventiva do eugenol em lesões hepáticas induzidas em ratos. Com a utilização de marcadores específicos para inflamação, a análise histológica revelou que o eugenol atua como inibidor da produção de COX-2, uma das enzimas responsáveis pela síntese de prostaglandinas na cascata do ácido aracídico. Também se constatou uma ação de diminuição de dano ao DNA celular na área da lesão induzida no fígado (Yogalakshmi et al., 2010).

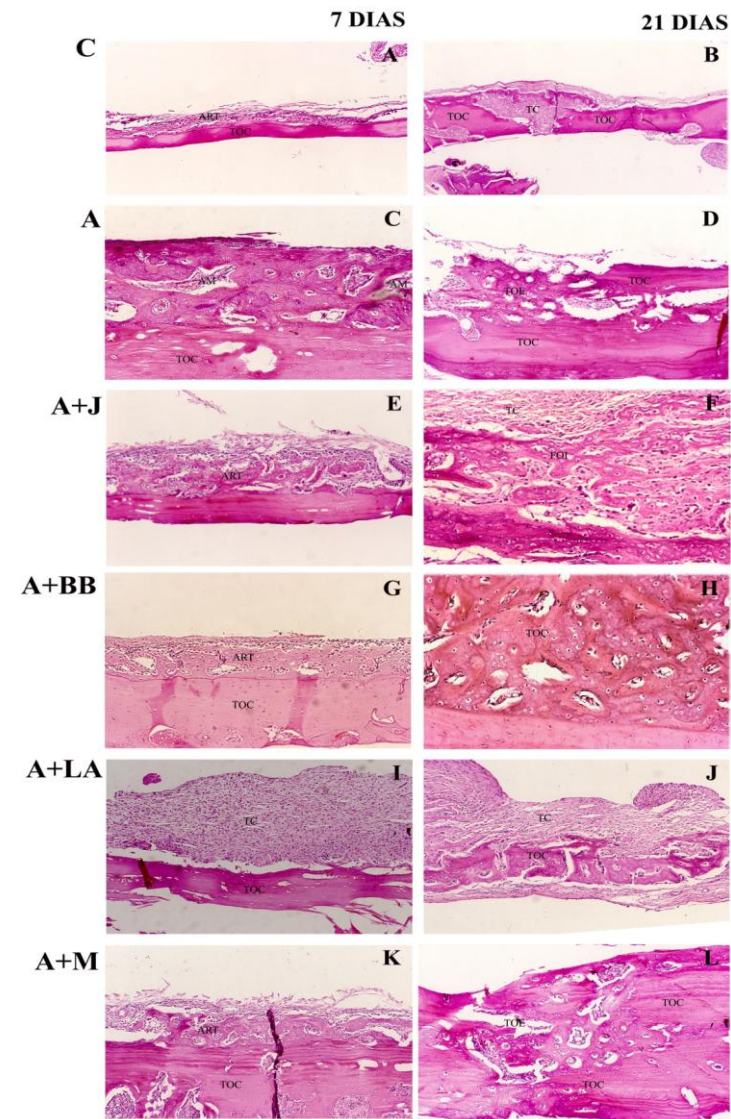
Outro produto natural, que aos poucos está sendo introduzido na odontologia, é o extrato da planta *Aloe vera*. Presente na maioria das regiões tropicais do planeta, esta planta possui mais de 324 espécies de ervas, arbustos e

árvores (ABC, 2010). A utilização desta planta em terapias é milenar, usada por povos egípcios e mediterrâneos para cura de ferimentos e enfermidades cutâneas. Em egípcio, ela é chamada de planta da imortalidade (Fowler et al., 2010). Dentre seus benefícios estão propriedades reidratantes, antiinflamatórias, antibióticas, além de ser uma fonte rica em vitaminas A, B1, B3, B6, B12, C e E (Reynolds, 1999). Estas propriedades já eram utilizadas como medicamento por outras áreas médicas, como na dermatologia, onde sempre atuou como um importante auxiliar no processo de cicatrização de ferimentos na pele (Singer et al., 1999). Uma pesquisa teve como objetivo avaliar a ação celular macrofágica da substância chamada de *acemannan*, extraída da planta *Aloe vera*, e purificada posteriormente. Constatou-se que a substância pode aumentar consideravelmente a ativação de macrófagos, tendo assim, potencial ação contra células cancerígenas (Djeraba et al., 2000).

2.3 EXTRATOS VEGETAIS NA TERAPIA DE ENXERTIA ÓSSEA

Técnicas de enxertia óssea são recomendadas para defeitos ósseos que comprometem a anatomia normal, ou a função do tecido mineralizado. Doenças ou acidentes podem causar tais deficiências (Stutzle et al., 1998). A neoformação óssea em indivíduos que apresentam perdas consideráveis de tecido é de grande importância para a Odontologia e Medicina. Em modelo *in vivo* (Bosh et al., 1998), um estudo experimental demonstrou que uma reconstrução óssea espontânea não acontece em defeitos cranianos de cinco milímetros de diâmetro, em ratos entre 5 e 6 meses de idade. Isto sugere que para o reparo de grandes áreas, um agente de preenchimento deve ser adicionado ao local do defeito ósseo, auxiliando assim na neoformação óssea. Assim, as chamadas substâncias osteopromotoras, substitutos ósseos, ou biomateriais de enxerto ósseo têm sido estudados há muito tempo. Vários materiais (alógenos, xenógenos, autógenos e

5.2 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA



(PIC) e áreas de fibrose (AF). Original magnificação 100 ×. ★-
Corresponde à área de luz do tubo onde cada biomaterial foi inserido.

RJ= Resina do Jatobá; LA= Leite do Amapá; RBB= Resina do Breu Branco; MA= Mistura Adesiva.

aloplásticos), amplamente descritos em literatura, podem ser usados como alternativas de enxertos ósseos, utilizados nas mais diversas técnicas de reconstrução.

Van de Putte & Urist, já em 1965, estudaram a osteogênese em implantes intramusculares de matriz óssea bovina descalcificada. Mais recentemente, os biomateriais de enxerto ósseo vêm sendo amplamente utilizados em situações clínicas; sugere-se a utilização criteriosa de substâncias como a hidroxiapatita de coral, osso descalcificado e liofilizado (xenógeno) em defeitos periodontais (Carranza, 1992).

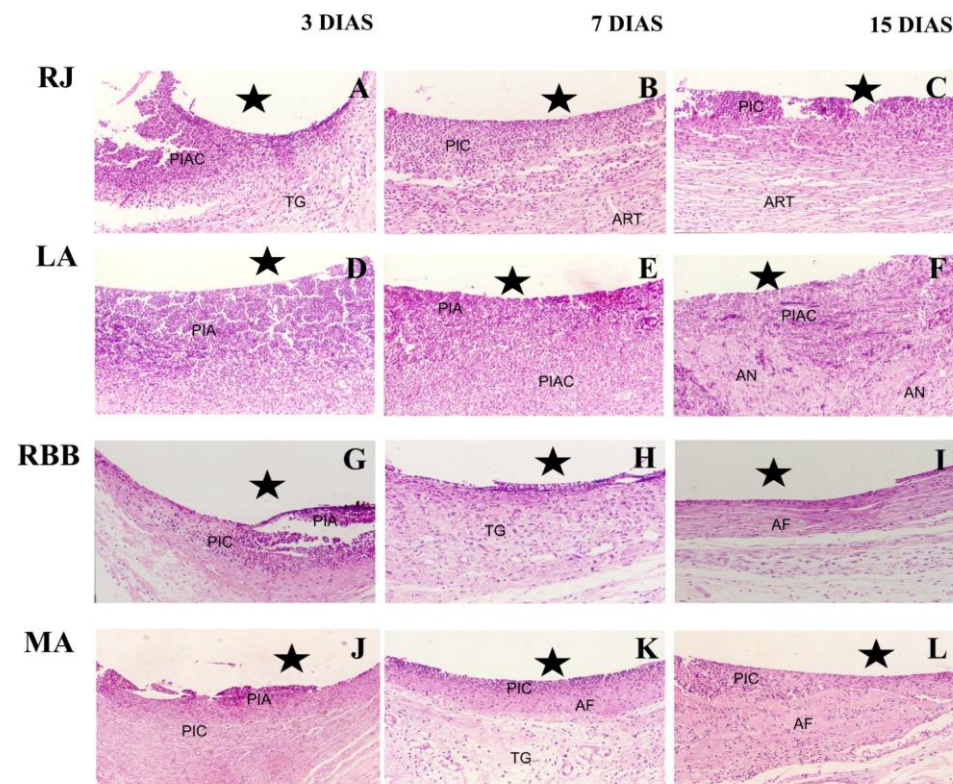
A hidroxiapatita de corais é um bom exemplo de material proveniente da natureza, com potencial de utilização em enxertos de osso bem relatado em literatura científica. Em 1979, um estudo (Holmes, 1979) avaliou o comportamento de blocos de hidroxiapatita em defeitos ósseos criados em mandíbulas de cães. Em 2 meses, a análise histológica constatou a formação de osso extremamente esponjoso, tornando-se lamelar em 6 meses. Em 12 meses notou-se que 29% da estrutura do bloco havia sido degradada, em um processo lento, que ocorreu após a neoformação óssea, além de se atestar a biocompatibilidade do material. Anos depois, um estudo envolvendo 25 pacientes humanos (Kenney et al., 1985), avaliou a ação de implantes de hidroxiapatita posicionados para tratar defeitos periodontais. A avaliação em 6 meses demonstrou diminuição significativa da profundidade dos defeitos e aumento na adesão tecidual gengival.

Hoje se sabe que, devido à sua capacidade osteoindutora, a hidroxiapatita tem sua principal indicação como material de preenchimento, mas é ineficiente na substituição de grandes volumes ósseos que foram perdidos (Buser et al., 1998).

A evolução da tecnologia em novos auxiliares para terapias de enxertia óssea visa o desenvolvimento de materiais que possam substituir porções de osso autógeno, usados em casos de transplantes. Neste campo, destacam-se

experimentos utilizando polímeros como materiais de substituição óssea (Kfuri et al., 2001). Os polímeros pertencem a um grupo de materiais naturais ou sintéticos, com alto grau de compatibilidade com tecidos vivos. Dentre todos, os mais empregados nas áreas da saúde são os silicones, ácido polilático, ácido poliglicólico, polidioxanona, polietileno, polipropileno, metilmetacrilato e as poliuretanas, podendo ser transformados em diferentes materiais como fibras, materiais de sutura, hastes, parafusos, placas, blocos e grampos (William et al., 1982). Em procedimentos de enxertia óssea, os polímeros apresentam como grande vantagem o fato de não necessitarem de uma região doadora, reduzindo o tempo de cirurgia, e a morbidade pós-operatória do paciente (Kfuri et al., 2001).

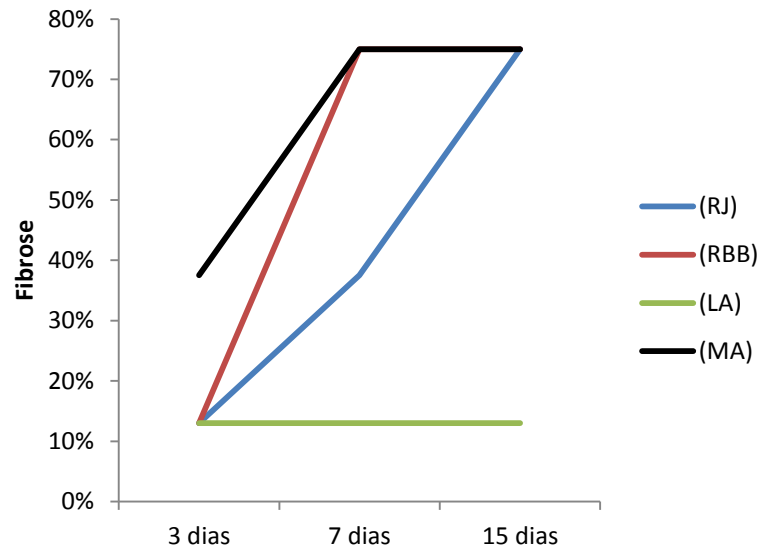
Pertencente ao grupo dos polímeros que são obtidos de forma natural, a poliuretana da mamona (*Ricinus communis* L) vem ganhando destaque em novas pesquisas relacionadas a materiais de substituição óssea, apesar de não ser exatamente uma novidade. As resinas poliuretanas vegetais surgiram em 1937 (Neto, 1997), sendo redescobertas como uma forma de tratamento moderna para doenças ou defeitos nos ossos (Ignácio et al., 2002). Um estudo *in vivo* avaliou a capacidade de osteocondutividade da poliuretana da mamona, com ou sem estimulação de fatores de crescimento (BMP). Com preenchimento dos defeitos criados na base da mandíbula de ratos e análise histológica posterior, observou-se uma formação de osso nas duas amostras. No grupo onde houve estimulação por BMP, obteve-se uma neoformação óssea, com trabeculado mais denso, e cortical mais compacta na comparação ao grupo onde foi utilizada somente a poliuretana (Ignácio et al., 2002). Outro estudo avaliou o comportamento de pinos absorvíveis feitos da poliuretana da mamona em côndilos femorais de coelhos. Os resultados demonstraram que não houve osseointegração dos implantes, havendo a formação de uma cápsula fibrosa na interface osso / corpo de prova (Kfuri et al., 2001).



A figura 12 mostra exemplares histológicos do teste de biocompatibilidade, de todos os grupos e períodos.

Figura 12 – **A:** presença de processo inflamatório agudo e crônico (PIAC) e tecido de granulação. **B:** processo inflamatório crônico (PIC) e área de reparação tecidual (ART). **C:** processo inflamatório crônico (PIC) e área de reparação tecidual (ART). **D:** processo inflamatório agudo (PIA). **E:** processo inflamatório agudo (PIA) e processo inflamatório agudo e crônico (PIAC). **F:** processo inflamatório agudo e crônico (PIAC) e áreas necróticas (AN). **G:** processo inflamatório crônico (PIC) e processo inflamatório agudo (PIA). **H:** tecido de granulação (TG). **I:** áreas de fibrose (AF). **J:** processo inflamatório crônico (PIC) e processo inflamatório agudo (PIA). **K:** processo inflamatório crônico (PIC), áreas de fibrose (AF) e tecido de granulação (TG). **L:** processo inflamatório crônico

Figura 11 – Pontos médios das faixas de frequências relativas das contagens de áreas de fibrose.



Outro material proveniente da natureza que está sendo introduzido neste campo é a celulose, mais precisamente na confecção de membranas, com utilização em enxertia óssea. Sua característica biodegradável despertou o interesse dos pesquisadores, com sua possível utilização como membranas absorvíveis em procedimentos de enxerto ósseo. Um estudo *in vitro* avaliou a capacidade proliferativa migratória de osteoblastos sobre 8 diferentes tipos de membranas, utilizadas em procedimentos de regeneração óssea guiada, através do cultivo de células osteoprogenitoras de ratos sobre suas superfícies. Os resultados apresentados indicaram que a membrana à base de celulose vegetal, apresentou índice de migração celular semelhante a outras membranas com o uso consagrado na terapia óssea. Destacaram-se também, os índices das membranas de colágeno bovino e de copolímeros de ácidos poli-lático e poli-glicólico (Takata et al., 2001). Outra pesquisa (Salata et al., 2001) avaliou o desempenho da membrana chamada de alkali-celulose, uma alternativa às membranas não-absorvíveis de politetrafluoroetileno (e-PTFE). Os testes *in vivo* foram realizados em defeitos transcorticais, criados em mandíbula de ratos. Os resultados demonstraram que a quantidade de osso neoformado foi similar nas duas membranas. A membrana de alkali-celulose apresentou uma ossificação endocondral, enquanto houve uma ossificação intramembranosa no grupo e-PTFE. Notou-se uma reação inflamatória mais exacerbada no grupo da membrana de alkali-celulose.

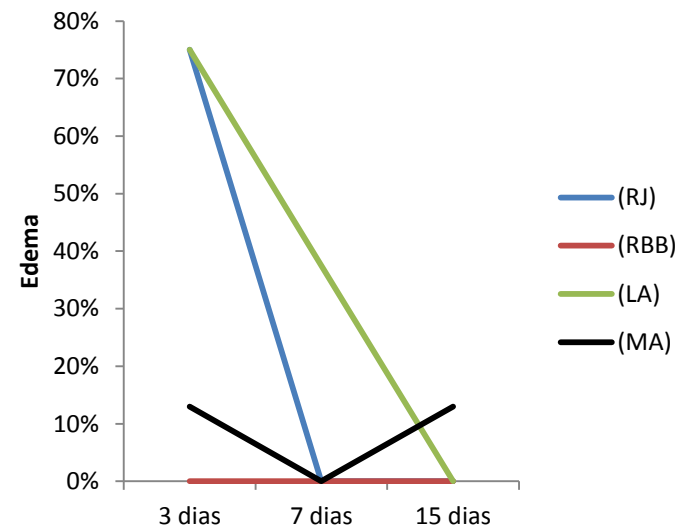
2.4 PLANTAS AMAZÔNICAS E RESPECTIVOS EXTRATOS (RESINAS)

2.4.1 *Protium heptaphyllum march*

O potencial medicamentoso dos extratos de plantas da espécie *Protium* foi revelado através da medicina popular, sendo o extrato utilizado como tonificante, estimulante, cicatrizante para úlceras e como agente anti-inflamatório em geral (Corrêa, 1984). A Resina do Breu branco é extraída do *Protium heptaphyllum march*, planta pertencente à família Borseraeae. É amplamente encontrada nas regiões norte e nordeste do território brasileiro, e popularmente usada como medicamento natural em casos de ferimentos e úlceras (Susunaga et al., 2001). As folhas e caule desta família de plantas é uma fonte natural de óleos essenciais (Siani et al., 2005). Os óleos essenciais, muito utilizados pela indústria cosmética e medicamentosa, são misturas complexas que podem conter 100 ou mais compostos orgânicos. Seus constituintes podem pertencer às mais diversas classes de compostos, porém os terpenos e os fenilpropenos são as classes de compostos mais comumente encontradas. Os terpenos encontrados com maior frequência nos óleos essenciais são os mono e os triterpenos (Yasukawa et al., 1996; Susunaga et al., 2001; Oliveira et al., 2004). Já os sesquiterpenos, assim como os diterpenos são constituintes minoritários dos óleos essenciais (Castro et al., 2004). A atividade anti-inflamatória proveniente do extrato do Breu Branco é atribuída a dois triterpenos presentes em sua composição, substâncias chamadas de α e β amyrrin, inibidores de proteína quinase que são produzidas por células eucarióticas (Hasmeda et al., 1999).

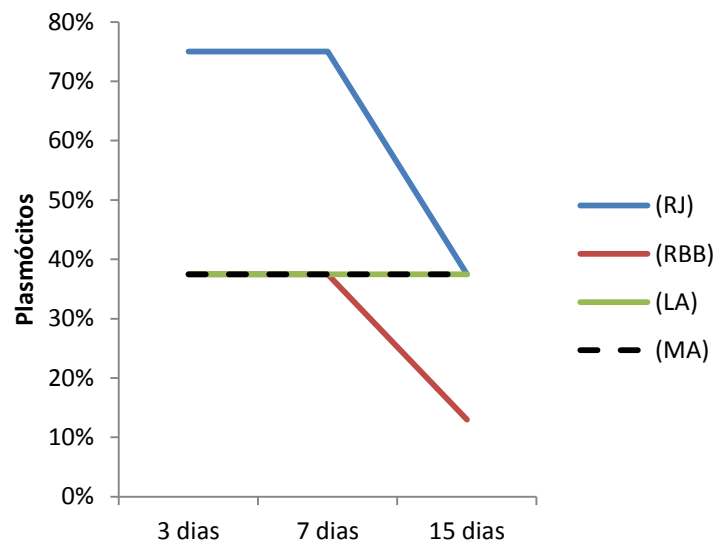
Terpeno é o nome que designa uma extensa e numerosa família de produtos naturais. Seus constituintes são compostos alcenos, uma subdivisão dos hidrocarbonetos.

Figura 10- Pontos médios das faixas de frequências relativas de áreas de edema.



Em relação ao processo de fibrose, foi possível verificar que há uma tendência de aumento em todos os grupos, com exceção do grupo submetido ao (LA), que se mantém constante na faixa de 1 – 25%. Todos os demais grupos elevam suas frequências para a faixa superior a 50% no período de 15 dias de experimentação (Gráfico 6).

Figura 9- Pontos médios das faixas de frequências relativas de plasmócitos.



Em relação aos edemas, verificou-se uma tendência de queda nas contagens dos grupos **(RJ)** e **(LA)** que reduziram às faixas de 0 – 1%. O grupo **(RBB)** manteve-se constante na faixa de 0 – 1%, enquanto o grupo **(MA)** apresentou a redução no período de 7 dias, havendo um aumento para a faixa de 1 – 25% no período de 15 dias, equivalente aos 3 dias de experimentação (Gráfico 5).

Armazenados nas folhas, flores, frutos, caules e raízes de muitas plantas, e em glândulas odoríferas de animais, os terpenos são responsáveis por grande parte dos cheiros exalados pelos campos e florestas. Estes hidrocarbonetos ocorrem em plantas e animais como múltiplos de uma unidade estrutural básica: o isopreno. A biossíntese do terpeno ocorre a partir da combinação de duas moléculas de ácido acético para formar ácido mevalônico. Este se converte em pirofosfato de isopentenila. Transformações posteriores do composto de isopentenila produzem os terpenos e os terpenóides (Hasmeda et al., 1999). Segundo o número de isoprenos presentes na molécula, têm-se os seguintes terpenos: 1) monoterpênos, como por exemplo, o limoneno (encontrado na essência do caule da laranjeira e na essência de terebentina ou aguarrás) e os alfa e beta pinenos, constituintes principais da essência de terebentina; 2) sesquiterpenos, cujos principais exemplos são o bisaboleno, encontrado na essência do limão, e o zingibereno, na essência de gengibre; 3) diterpenos, como a vitamina A; 4) sesterpenos; triterpenos; tetraterpenos, entre os quais se encontram os pigmentos carotenóides; e 5) politerpenos, que têm de mil a cinco mil unidades de isoprenos, como a borracha natural e gutapercha (Castro et al., 2004).

Na medicina, os terpenos são empregados, na maior parte das vezes, como irritantes locais, ainda que se lhes atribuam outros efeitos benéficos. Alguns dos compostos utilizados como constituintes de remédios simples são o hidrato de terpina, o óleo de madeira de cedro, o timol, o cineol, o eucaliptol e o mentol (Martins, 1989).

As substâncias α e β amyrin são descritas como tendo propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, sendo ricas em triterpenóides, responsáveis por tais propriedades. Um estudo em ratos revelou propriedades protetoras da mucosa gástrica e anti-toxicidade hepática, em lesões induzidas por paracetamol (Oliveira et al., 2005). Acrescentaram Bertolucci et al. (2001), que os óleos

essenciais apresentam atividade farmacológica muito diversa, às vezes polivalente, devendo-se referir a cada um deles de maneira individual. Os fenóis estão entre os mais importantes constituintes vegetais que dão origem a outros produtos como os taninos, que são substâncias químicas complexas, polifenólicas, ligadas a outros compostos aromáticos, que estão distribuídos em todas as partes da planta para protegê-la contra herbívoros, inibir a germinação de sementes e a ação de bactérias fixadoras de nitrogênio; os taninos contribuem para formar uma camada protetora sobre a pele e as mucosas, atuando em infecções no olho, cérvix, reto, vagina e boca; provocam a contração de capilares, colaborando nos casos de hemorragias (Martins et al., 1989).

Cientificamente, também existem relatos de propriedades anti-sépticas, quando utilizados em doenças de pele, e propriedades antitumorais (Pernet, 1972) é. Em um estudo *in vivo* que avaliou o potencial analgésico do extrato resino-oleoso de uma planta da família das Borseraceae, comprovou-se a atividade não-opiíode da substância, com redução considerável do processo inflamatório inicial (Susunaga, 2001) não foi citado nas referências. Outro estudo avaliou a atividade anti-inflamatória da substância

composta **α e β amyrrin** (triterpenos pentacíclicos), isoladas da resina laboratorialmente, em um modelo de periodontite aguda induzida em ratos. Como resultado, observou-se que a substância moderou o processo inflamatório, reduzindo infiltrado de neutrófilos, estresse oxidativo e citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α (Vieira Junior et al., 2005).

Outro estudo, também realizado em ratos, avaliou a capacidade de ligação da mistura de **α e β -amyrrin** com receptores GABA-A. Os animais foram submetidos a testes com o intuito de avaliar sua reação comportamental quando medicados (via oral) com **α e β -amyrrin**, antidepressivos e ansiolíticos, bem como água destilada (grupo controle). Todos foram submetidos aos mesmos testes físicos e de raciocínio, situações de estresse e tempo de sono. Os

Figura 8- Pontos médios das faixas de frequências relativas de linfócitos.

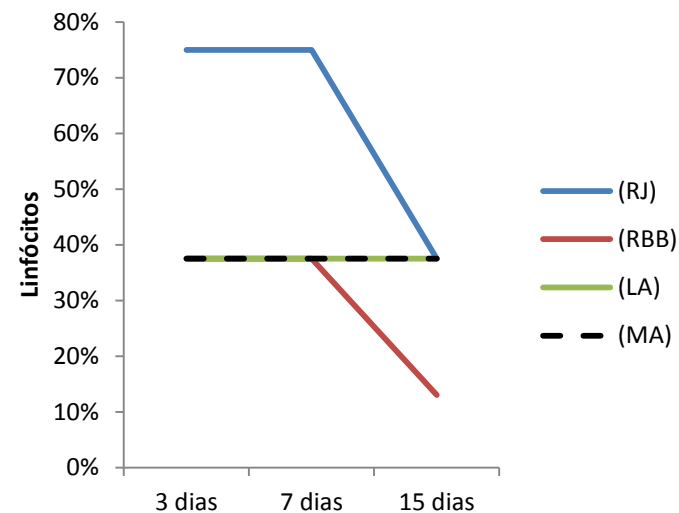
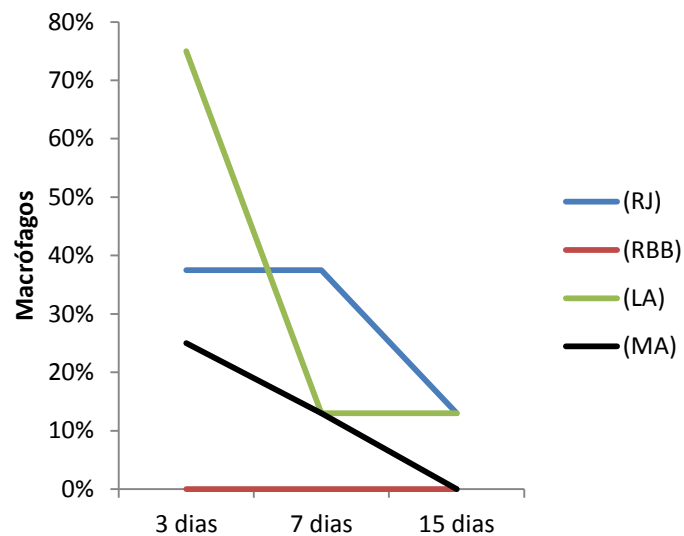


Figura 7- Pontos médios das faixas de frequências relativas de macrófagos.



Sobre os linfócitos e plasmócitos, as mesmas variações foram observadas. Observaram-se valores constantes nos tempos de 3 e 7 dias, havendo uma redução das contagens apenas para os grupos **(RJ)** (25 – 50%) e **(RBB)** (1 – 25%). Os grupos **(LA)** e **(MA)** mantiveram valores constantes durante todo o período experimental (25 – 50%) (Gráficos 3 e 4).

resultados obtidos sugeriram que o mecanismo de ação da α e β -**amyrin** se assemelha ao de medicamentos ansiolíticos, gerando atividades hipnótica e sedativa. Foi constatado também um aumento na atividade da noradrenalina, o que sugere uma atividade antidepressiva (Aragão et al., 2006).

2.4.2 *Hymenaea courbaril* L

A árvore do Jatobá, que tem o nome científico de *Hymenaea courbaril* L., é da espécie Leguminosae-Caesalpinioideae, presente em boa parte do território nacional (do Rosário et al., 2011). Sua casca e resina são amplamente utilizadas na medicina popular, seus frutos são fonte de alimento para pessoas e animais (Fernandes, 2006). É composta por óleos essenciais, taninos, substâncias amargas, matérias resinosas e pécnicas, amido e açúcar. Um estudo que teve como objetivo avaliar a versatilidade do uso de plantas medicinais da caatinga brasileira concluiu ser a *Hymenaea courbaril* L. um terapêutico natural contra inúmeras enfermidades (Cartaxo et al., 2010). As folhas e a casca possuem compostos terpênicos e fenólicos, tendo relatos de efeitos como anti-microbianos, anti-fúngicos, antibacterianos, expectorante, laxante e sedativo comprovados em vários estudos, o que valida sua longa história de uso contra vários males (Stubblebine et al., 1980 ; Lorenzi e Matos, 2002; Duke, 2003). Relatou-se também propriedades anti-oxidativas e hepatoprotetoras (Plantamed, 2010).

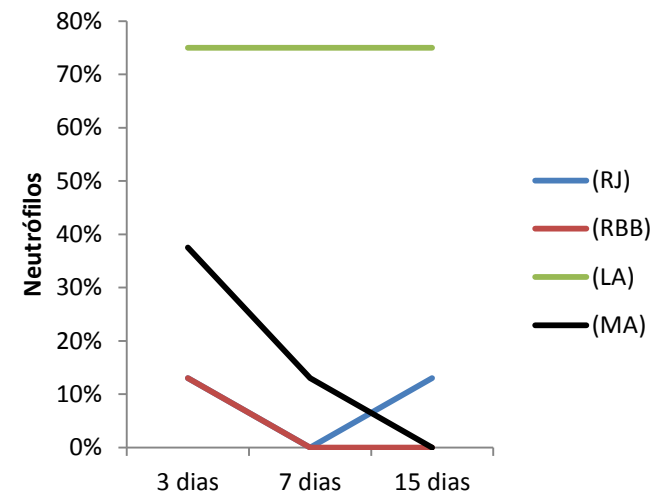
Uma pesquisa teve como objetivo elucidar os princípios ativos do extrato, a fim de mapear os componentes presentes na *Hymenaea courbaril* L. Por meio de fracionamento, os pesquisadores conseguiram o completo isolamento e configuração dos diterpenóides presentes no extrato. Foram descobertos três novos diterpenóides, que submetidos a análise espectral e testes de citotoxicidade, revelaram sua ação apoptótica sobre células cancerígenas de ovário de linhagem celular A2780 (Abdel-Kader et al.,

2002). Outro estudo avaliou a ação celular de xiloglucanos, obtidos de três sementes de árvores da flora brasileira, dentre elas, a semente da *Hymenaea courbaril L.* Uma cultura celular foi feita, especificamente com células macrofágicas, obtidas do peritônio de ratos. Resultados apresentados demonstraram que a resposta celular a estes polissacarídeos é de ativação no processo de fagocitose. Este fato é de extrema importância, considerando a ação exercida por esses tipos de polissacarídeos de origem vegetal em células cancerígenas, inibindo o crescimento de tumores e metástases (do Rosário et al., 2011) .

2.4.3 *Brosimum Parinarioides Ducke*

O amapá-doce (*Brosimum Parinarioides Ducke*) é uma espécie arbórea da qual um tipo de látex pode ser extraído de seus troncos, o popularmente conhecido “leite” do Amapá-doce (Gallupo et al., 2004). É utilizado pelas comunidades rurais da Amazônia como leite vegetal, na alimentação humana e na medicina popular. Seu uso como fitoterápico possui relatos meramente descritivos (Gai et al., 2009). Está relacionado à ação anti-inflamatória, atuando principalmente no trato respiratório e como fortificante (Quadros et al., 2007). Em várias comunidades amazônicas espalhadas pela América é conhecido como sendo um poderoso cicatrizante de feridas. Recentes pesquisas na área de farmacologia atestaram no látex, a presença de óleos essenciais alcalóides, antraquinonas, derivados de cumarina, purinas, esteróides e triterpenóides, sendo todos esses compostos associados a diferentes tipos de aplicações farmacológicas. Além das propriedades farmacológicas, o “leite” do amapá-doce apresenta um alto teor de proteína e cálcio, superando os leites de soja e vaca, sendo usado como

Figura 6 – Pontos médios das faixas de frequências relativas de neutrófilos.



Em relação aos macrófagos, foi possível verificar que todos os grupos tiveram uma redução em suas contagens, com exceção do grupo (RBB) que sempre se manteve em frequência de 0% – 1%. Ao final do período experimental o grupo (MA) apresentou frequência de 0 – 1%, enquanto os grupos (RJ) e (LA) apresentaram-se na faixa de 1 – 25% (Gráfico 2).

Tabela 7 – Médias das variáveis das células inflamatórias.

		Neutrófilo	Macrófago	Linfócito	Plasmócito	CG	Necrose	Edema	Fibrose
(RJ)	3 dias	1 - 25%	25 - 50%	> 50%	> 50%	0 - 1%	0 - 1%	> 50%	1 - 25%
	7 dias	0 - 1%	25 - 50%	> 50%	> 50%	0 - 1%	0 - 1%	0 - 1%	25 - 50%
	15 dias	1 - 25%	1 - 25%	25 - 50%	25 - 50%	0 - 1%	0 - 1%	0 - 1%	> 50%
(RBB)	3 dias	1 - 25%	0 - 1%	25 - 50%	25 - 50%	0 - 1%	0 - 1%	0 - 1%	1 - 25%
	7 dias	0 - 1%	0 - 1%	25 - 50%	25 - 50%	0 - 1%	0 - 1%	0 - 1%	> 50%
	15 dias	0 - 1%	0 - 1%	1 - 25%	1 - 25%	0 - 1%	0 - 1%	0 - 1%	> 50%
(LA)	3 dias	> 50%	> 50%	25 - 50%	25 - 50%	0 - 1%	0 - 1%	> 50%	1 - 25%
	7 dias	> 50%	1 - 25%	25 - 50%	25 - 50%	0 - 1%	25 - 50%	0 - 1%	1 - 25%
	15 dias	> 50%	1 - 25%	25 - 50%	25 - 50%	0 - 1%	0 - 1%	0 - 1%	1 - 25%
(MA)	3 dias	25 - 50%	1 - 50%*	25 - 50%	25 - 50%	0 - 1%	0 - 1%	1 - 25%	25 - 50%
	7 dias	1 - 25%	1 - 25%	25 - 50%	25 - 50%	0 - 1%	0 - 1%	0 - 1%	> 50%
	15 dias	0 - 1%	0 - 1%	25 - 50%	25 - 50%	0 - 1%	0 - 1%	1 - 25%	> 50%

Os pontos médios destas faixas de frequência relativa foram plotados nos gráficos a seguir.

Em relação à avaliação dos neutrófilos, foi evidente que a frequência destas células manteve-se constante (>50%) ao longo de toda a experimentação, enquanto os grupos **(MA)** e **(RBB)** reduziram suas frequências até 0% ao final do período. O grupo submetido ao **(RJ)** apresentou um leve aumento para 1 – 25% no 15º dia de experimento (Gráfico 1).

substituto destes produtos em algumas regiões (Embrapa, 2004).

Apesar de todas estas características positivas, o leite de amapá-doce é um produto altamente perecível, necessitando de cuidado especial em sua manipulação e acondicionamento (Embrapa, 2002). O potencial antioxidante da casca e do látex extraídos do *Brosimum Parinarioides Ducke* foi avaliado através de fotometria, utilizada para avaliar substâncias capazes de sequestrar radicais. O látex foi suspenso em metanol e filtrado. O material filtrado foi ressolubilizado em uma solução hidroalcoólica metanol/água (9:1) e então particionado em diclorometano e acetato de etila. O material sólido foi ressuspenso em diclorometano. As cascas de *B. parinarioides* foram secas, moídas, extraídas por maceração hexano e depois em metanol. O extrato em metanol foi concentrado. E em seguida submetido a sucessivas partições líquido-líquido com hexano, clorofórmio e acetato de etila, que resultou em quatro frações de diferentes polaridades. Foi determinado também o teor de fenólicos totais, para observar a correlação da atividade antioxidante com a presença destes tipos de substâncias. Os resultados observados indicam correlação entre o teor de fenólicos totais e da atividade antioxidante. As frações hidroalcoólica e acetato de etila apresentaram os maiores teores de fenólicos totais e atividade antioxidante. Embora em menor quantidade, a casca de *B. parinarioides* também apresenta atividade antioxidante com IC₅₀ de 29,4 mg/mL (Quadros et al., 2007).

Outro estudo investigou a atividade antioxidante de três substâncias extraídas de folhas e frutos provenientes de árvores amazônicas. O extrato da folha da árvore da espécie *Brosimum* (em concentração de 35 µg/mL) apresentou resultados relevantes (níveis de inibição oxidativa de 42,38 a 91,51%) em comparação à análise com o ácido ascórbico

(níveis de 99 à 100%), por meio de testes de DPPH e ABTS. Resultados de análise espectral revelaram a presença de sinais de substâncias aromáticas, possivelmente flavonóides. Este fato atesta a capacidade anti-oxidativa em níveis consideráveis (Gonçalves et al., 2006). Outra pesquisa investigou o potencial terapêutico do látex extraído do *Brosimum Parinarioides Ducke ssp.* O látex, extraído, após redução de volume, submeteu-se a partição com diclorometano (BPD), acetato de etila (BPA). Realizou-se uma cromatografia, indicando a presença de terpenóides e esteróides, além de cumarinas e compostos fenólicos e taninos. Os resultados demonstraram que os princípios ativos foram extraídos pelo diclorometano (BPD) e principalmente pelo acetato de etila (BPA). Posteriormente, foi avaliada a atividade sobre células tumorais humanas em cultura: células de mama (MCF-7), pulmão (NCI-460), melanoma (UACC-62), próstata (PC-O3), rim (786-0), cólon (HT-29) e mama resistente (NCI-ADR). Após 2 dias de tratamento, realizou-se o cálculo da concentração inibitória. Concluiu-se que BPA apresentou os melhores resultados, agindo com seletividade para a linhagem celular de câncer renal, provavelmente por consequência da ação de terpenóides e esteróides (Ruiz et al., 2006)

3 OBJETIVOS

3.1 Avaliar a biocompatibilidade dos extratos (resinas) isolados ou em associação quando implantados no tecido subcutâneo de ratos.

3.2 Avaliar a influência dos extratos (resinas) em associação com osso autógeno no reparo de defeito ósseo realizado na calvária de ratos.

Tabela 6- Escores de todas as amostras (A) no tempo de 15 dias

15 DIAS	Neutrfl:	Macrof:	Linfócit:	Plasmct	CG	Necros:	Edema	Fibrose
(RJ) - Escores								
A1	0	1	3	3	0	0	0	3
A2	1	1	2	2	0	0	0	3
A3	0	0	2	2	0	0	0	3
A4	1	0	1	1	0	0	0	3
(LA) - Escores								
A1	3	1	2	2	0	1	0	1
A2	3	2	3	3	0	3	1	0
A3	3	1	2	2	0	0	0	1
A4	1	1	2	2	0	0	1	1
(RBB) - Escores								
A1	0	0	1	1	0	0	0	3
A2	0	0	1	1	0	0	0	3
A3	0	0	1	1	0	0	0	3
A4	2	1	2	2	0	0	0	2
(MA) - Escores								
A1	0	0	1	1	0	0	0	3
A2	0	0	2	2	0	0	1	3
A3	0	0	2	2	0	0	0	3
A4	0	1	2	2	0	0	1	3

Os dados referentes às modas dos dados de neutrófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos, CG, necrose, edema e fibrose estão demonstradas na tabela 7.

teciduais necróticas em duas das quatro amostras, sendo que a amostra (L2) apresentou escore máximo para o fator necrose (>50%).

O grupo **Resina Breu Branco** demonstrou uma característica tecidual de normalização em 15 dias, apresentando processo inflamatório crônico muito discreto, com alguns neutrófilos em uma das quatro amostras (1-25%). Houve um predomínio de linfócitos e plasmócitos, e presença mínima de macrófagos. Notou-se uma característica de fibrose intensa peritubular em todas as amostras (> 50%).

Ao analisar o grupo **Mistura Adesiva** constatou-se que, a exemplo do grupo Breu Branco no mesmo período de análise, o tecido apresentava um aspecto tecidual de reparação. Um processo inflamatório linfoplasmocitário de natureza crônica foi observado, com alguns macrófagos em permeio (1-25%). A região ao redor do tubo de polietileno apresentou áreas de fibrose tecidual, com elevada intensidade.

.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS (RESINAS)

Os extratos vegetais de 3 árvores foram preparados conforme técnicas padrão de extração *in loco*. A forma de extração das resinas e do látex do Amapá-doce procedem da mesma forma como se extrai o látex das seringueiras. São feitos cortes verticais no caule da árvore, e as substâncias são coletadas. Em seguida, os extratos foram devidamente acondicionados e transportados até laboratórios do departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Então, o preparo de uma mistura adesiva, a partir dos 3 extratos anteriormente descritos, foi elaborado da seguinte forma: após a associação dos extratos individuais, a mistura foi submetida à fermentação com colônias de bactérias da espécie *Caulobacter crescentus*, uma bactéria gram-negativa e não patogênica cujo habitat inclui todos os ambientes aquáticos e muitos tipos de solo, e tem sido extensivamente estudada por seu ciclo celular único, no qual duas células-filhas distintas são geradas através de diferenciação e de divisão celular assimétrica. Esta bactéria se encontra presente na maioria dos organismos vivos, e não é tóxica (Poindexter, 1978; Poindexter, 1981). Finalmente, a mistura foi submetida a um processo enzimático obtendo-se uma forma pastosa, de cor castanha escuro, com característica adesiva.

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os procedimentos realizados neste experimento foram conduzidos de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e tiveram sua aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Positivo, Curitiba, Paraná (144.08 A).

4.2.1 Teste de biocompatibilidade subcutâneo

Nesta etapa, foram utilizados 12 ratos Wistar, machos, com idade aproximada de 3 meses e com massa média de 400 gramas, provenientes do biotério da Universidade Positivo, Paraná. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12h, (luz após as 7:00 horas) e com livre acesso a água e comida. Os animais foram divididos em 3 grupos (tabela 1), sendo que em cada grupo havia um animal com quatro sítios de aplicação de material experimental: resina do Jatobá (**RJ**) e resina do Breu Branco (**RBB**), ambos em veículo viscoso; Leite do Amapá-doce (**LA**) e a associação de todos os extratos, chamada de mistura adesiva (**MA**).

Tabela 5- Escores de todas as amostras (A) no tempo de 7 dias

7 dias	Neutrfs	Macrofg	Linfócits	Plasmcts	CG	Necrose	Edema	Fibrose
(RJ) - Escores								
A1	0	3	3	3	0	0	0	2
A2	1	2	3	3	0	0	0	2
A3	0	2	3	3	0	0	0	2
A4	0	2	3	3	0	0	2	2
(LA) - Escores								
A1	2	2	2	2	0	2	0	1
A2	3	1	2	2	0	2	0	1
A3	3	1	2	2	0	1	0	1
A4	3	1	2	2	0	2	0	1
(RBB) - Escores								
A1	0	0	1	1	0	0	0	3
A2	0	0	2	2	0	0	0	3
A3	0	1	2	2	0	0	0	2
A4	2	2	2	2	0	0	0	1
(MA) - Escores								
A1	0	1	2	2	0	0	0	2
A2	1	1	2	2	0	0	0	2
A3	1	1	2	2	0	0	0	3
A4	2	1	2	2	0	0	0	3

c) Análise em 15 dias

Em 15 dias, **Resina Jatobá** ainda apresentou discreto quadro inflamatório neutrofilico, com infiltrado linfoplasmocitário mais moderado se comparado ao tempo experimental de sete dias (25-50%). Também se observou a presença de áreas de intensa fibrose em todas as amostras (>50%).

A análise do grupo **Leite do Amapá** revelou a presença de intenso infiltrado inflamatório neutrofilico, o que sugere um quadro agudo de inflamação ainda instalado. Demonstrou também presença de macrófagos, menos intensa se comparada as amostras do mesmo grupo, em 3 e 7 dias. Um fato relevante foi novamente a presença de áreas

b) Análise em 7 dias

Em sete dias, o grupo **Resina Jatobá** apresentou um quadro discreto de processo inflamatório agudo neutrofílico, com área sugestiva de edema em apenas uma das amostras (0-1%). Inflamação de caráter inespecífico, com presença moderada de macrófagos. Observou-se uma grande quantidade de plasmócitos e linfócitos (>50% em ambas as análises), caracterizando um quadro intenso de inflamação crônica.

O grupo **Leite do Amapá** demonstrou uma característica de inflamação aguda severa neste tempo experimental (>50), aliado a um processo crônico linfoplasmocitário de média intensidade (25-50%). Este processo se revela de forma intensa e difusa, em permeio a áreas necróticas (25-50%).

A análise do grupo **Resina Breu Branco** mostrou uma característica inflamatória predominantemente crônica, e de média intensidade (25-50%). Demonstrou também um quadro agudo bem localizado ao redor dos tubos de polietileno, onde ainda se observaram poucos neutrófilos. Notou-se uma característica de reorganização tecidual mais acentuada em comparação à Resina Jatobá e Leite do Amapá.

O grupo **Mistura Adesiva** revelou uma característica inflamatória crônica, com poucos indícios de inflamação aguda ainda instalada. Apresentou um baixo índice de células macrofágicas, e áreas difusas de intensa fibrose (<50%). Característica de reorganização tecidual semelhante ao grupo Breu Branco.

Tabela 1: Grupos experimentais e período de realização da eutanásia (Cintra et al., 2010)

GRUPOS	EUTANÁSIA
Grupo 1 (4 animais)	3 dias
Grupo 2 (4 animais)	7 dias
Grupo 3 (4 animais)	15 dias

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados usando técnica asséptica, sob anestesia induzida pela injeção de ketamina (40mg/kg) (BAYER, Brasil) e xilazina (5 mg/kg) (BAYER, Brasil) (Wixson et al., 1987; Flecknell, 1991). No local determinado para cada sítio, foram feitas 4 incisões padronizadas de 8 mm de comprimento e 18 mm de profundidade. Com ajuda de uma seringa de vidro estéril de 10 ml, os materiais experimentais foram inseridos em tubos de polietileno de 10 mm de comprimento por 1,2 mm de diâmetro, com uma das extremidades selada (fig. 1). Os tubos foram introduzidos nas 4 incisões no dorso dos animais, sempre com a boca do tubo virada para o lado da cabeça do animal. Esta conduta auxiliou na determinação da área a ser coletada posteriormente. As incisões foram numeradas de **1** a **4**, partindo da extremidade superior esquerda para a extremidade superior direita no dorso do animal, como demonstrado (fig. 2).



Figura 1 – Tubos de polietileno autoclavados, já preenchidos pelos materiais experimentais.

Em seguida, os tecidos das incisões foram reposicionados e a pele suturada com fio de sutura 3.0 (Johnsson & Johnsson, Brasil). Os tempos de eutanásia propostos foram aguardados. Decorridos os períodos experimentais, os animais foram sacrificados em câmara de gás carbônico, e a biópsia excisional da área dos materiais aplicados foi realizada.

uma das quatro amostras analisadas.

A análise do grupo **Mistura Adesiva** revelou uma característica de inflamação aguda de média intensidade (25-50%), aliado a um quadro inflamatório linfoplasmocitário de moderada intensidade (25-50%), com número reduzido de macrófagos. Houve baixo índice de edema e fibrose neste grupo (1-25%).

Tabela 4 – Escores de todas as amostras (A) no tempo de 3 dias.

3 DIAS	Neutrfl:	Macrof:	Linfócit:	Plasmct	CG	Necros:	Edema	Fibrose
(RJ) - Escores								
A1	1	2	3	3	0	0	3	0
A2	0	1	3	3	0	0	1	1
A3	2	1	3	3	0	0	0	3
A4	1	2	3	3	0	0	3	1
(LA) - Escores								
A1	3	3	2	2	0	0	3	0
A2	3	3	2	2	0	0	3	1
A3	3	3	2	2	0	0	3	1
A4	3	3	2	2	0	1	3	1
(RBB) - Escores								
A1	1	1	2	2	0	0	0	1
A2	0	0	1	1	0	0	1	2
A3	1	2	2	2	0	0	0	1
A4	0	0	2	2	0	0	0	3
(MA) - Escores								
A1	1	1	2	2	0	0	3	2
A2	0	3	2	2	0	0	1	2
A3	2	0	2	2	0	0	1	1
A4	2	2	2	2	0	0	0	1

5 RESULTADOS

5.1 TESTE DE BIOCOMPATIBILIDADE

Os resultados apresentados pela análise histológica demonstraram o comportamento do infiltrado inflamatório dos animais, frente a cada uma das substâncias empregadas.

a) Análise em 3 dias

Em três dias, a **Resina Jatobá** apresentou quadro de inflamação agudo, com presença discreta a moderada de um infiltrado neutrofílico. Foi observado também um processo inflamatório crônico, predominantemente linfoplasmocitário, com intensa presença de macrófagos. Constatou-se a ausência de células gigantes do tipo corpo estranho. Um quadro de fibrose moderada foi observado, sendo mais intensa em uma das amostras (L3), apresentando predominância de 25 a 50%. Áreas de intenso edema foram observadas em duas das quatro amostras.

Ao observar as lâminas referentes ao **Leite do Amapá**, notou-se um infiltrado inflamatório agudo, com presença de neutrófilos em todas as amostras pertencentes a este grupo (>50 %). Características de inflamação crônica linfoplasmocitária também foram observadas, assim como a presença de grande número de células macrofágicas. Um fato que chamou a atenção neste grupo foi a grande perfusão tecidual desta substância, com grande área sugestiva de edema (> 50%), e uma das amostras analisadas apresentou necrose tecidual.

No grupo **Resina Breu Branco** observou-se um discreto infiltrado inflamatório agudo, com poucas células neutrofílicas (1- 25%) e, um infiltrado moderado de linfócitos e plasmócitos, com reduzida presença de macrófagos. Constatou-se também, um quadro de fibrose de baixa intensidade, com edema sendo observado em apenas

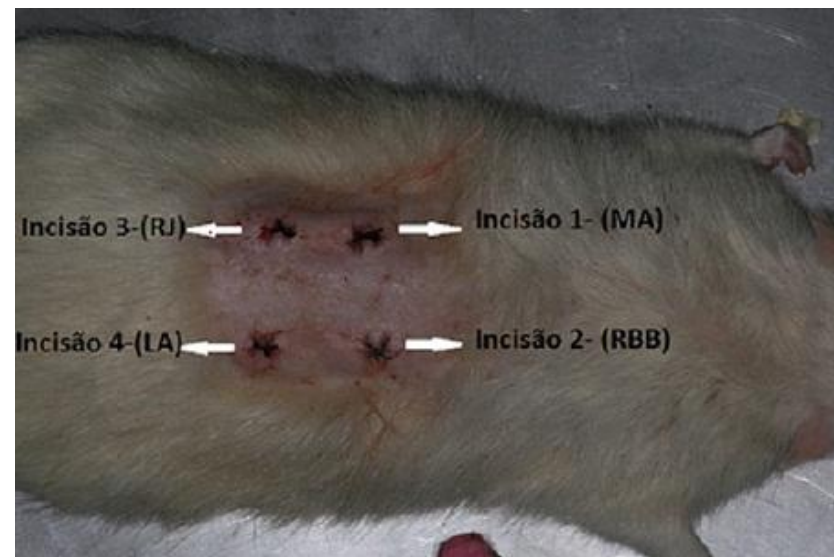


Figura 2 – Disposição das incisões no dorso do animal. Incisão 1: tubo de polietileno contendo mistura adesiva (MA); incisão 2: tubo de polietileno contendo a resina do Breu Branco (RBB); incisão 3: tubo de polietileno contendo a resina do Jatobá (RJ); incisão 4: tubo de polietileno contendo o Leite do Amapá (LA).

4.2.2 Teste de aplicação em enxertia óssea

Nesta etapa foram utilizados 36 ratos Wistar, machos, com idade aproximada de 3 meses e com massa média de 240 gramas, provenientes do biotério da Universidade Positivo. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12h, (luz após as 7:00 horas) e com livre acesso a água e comida.

4.2.2.1 Grupos

Os animais foram divididos em 12 grupos experimentais (tabela 2), com eutanásia programada para obtenção das peças para análise histológica de 7 e 21 dias. Cada um destes animais sofreu uma intervenção cirúrgica com dois defeitos contralaterais (fig. 3).

Tabela 2: Descrição dos grupos experimentais

GRUPOS	PROCEDIMENTO
Coágulo (C)	O grupo controle foi formado por animais nos quais foram confeccionados os defeitos ósseos, e não houve qualquer tipo de preenchimento, apenas manteve-se o coágulo posicionado.
Autógeno (A)	Os animais pertencentes ao grupo enxerto autógeno, após a confecção dos defeitos ósseos, receberam enxerto autógeno como material de preenchimento.
Autógeno + Jatobá (A+J)	Os animais deste grupo receberam como material de preenchimento dos defeitos ósseos o enxerto autógeno, associado ao substrato da Resina do Jatobá.
Autógeno + Breu Branco (A+BB)	Os defeitos confeccionados neste grupo foram preenchidos por osso autógeno, associado ao substrato da Resina do Breu Branco.
Autógeno + Leite do Amapá (A+LA)	Os defeitos ósseos deste grupo foram preenchidos com enxerto autógeno, associado ao Leite do Amapá Doce.
Autógeno + Mistura Adesiva (A+MA)	Neste grupo foi utilizado como material de preenchimento dos defeitos, o enxerto autógeno associado à Mistura Adesiva.

Tabela 3 – Classificação dos escores de contagem de neutrófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos, CG, necrose, edema e fibrose

Escores	Faixas de Frequência Relativa
0	0 – 1%
1	1 – 25%
2	25 – 50%
3	> 50%

As modas foram transformadas em pontos médios de cada uma das faixas de frequência relativa e posteriormente demonstradas em gráficos de tendência em função do tempo de experimentação.

4.6.2 HISTOMORFOMETRIA

Os dados relativos aos valores máximos dos tecidos ósseo e conjuntivo no grupo (C) e nos grupos experimentais (A), (A+J), (A+BB), (A+LA) e (A+M) foram avaliados em 3 pseudoréplicas por animal (3 leituras em cada lâmina histológica). Destas pseudoréplicas foram calculadas as médias por rato, sendo este valor considerado o ponto de equilíbrio individualizado. Os valores resultantes foram comparados entre os grupos em relação aos períodos experimentais por meio do teste Análise de Variância Fator Duplo (Two-way-ANOVA), após confirmação de normalidade dos dados analisada por meio do teste de Lilliefors. O teste de acompanhamento após a aplicação da ANOVA foi o teste *Least Square Difference* (LSD) para avaliar as diferenças entre as amostras em uma combinação de 2 x 2. Em todos os testes foi utilizado um nível de significância de 0,05.

com uma câmera fotográfica acoplada em microscópio de luz, possibilitando capturas de imagens em aumento de 40 vezes. Este procedimento nós permitiu estender a análise por toda a superfície do defeito. Após a digitalização, as fotos foram transferidas para o programa ImageToll 3.0, previamente calibrado com as medidas necessárias. A calibração foi feita com uma das fotos das lâminas, contendo em sua imagem, uma barra de medidas, desenvolvida em uma câmara de Neubauer, especificamente para o aumento em 40 vezes. Com isto, o programa é capaz de mensurar em micrômetros, a área de interesse. As medições foram feitas de forma linear, com a ferramenta “régua” do programa, abrangendo basicamente duas medidas teciduais por foto capturada: a maior espessura visível de tecido ósseo (ETO), e a maior espessura visível de tecido conjuntivo (ETC), em ambos os tempos experimentais utilizados.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.6.1 Biocompatibilidade

Os dados referentes à contagem de neutrófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos, células gigantes do tipo corpo estranho (CG), necrose, edema e fibrose foram analisadas quanto à moda em 4 amostras de ratos. Estas contagens foram classificadas em escores, conforme demonstrados na tabela 3:

4.2.2.2 Protocolo cirúrgico

Todos os cuidados necessários para o controle de infecção foram tomados, utilizando técnica asséptica, tais como desinfecção de equipamentos e esterilização de instrumentais em autoclave. Assim, todos os seguintes procedimentos foram executados.

Após sedação com isoflurano (Merck, Brasil), os animais foram devidamente pesados em balança (Bel Mark 500, Quimis, Brasil), e anestesiados (IP) com ketamina (40mg/kg) e xylazina (5mg/kg). O animal foi posicionado em mesa cirúrgica (Zielak et al., 2000), de forma a ficar imóvel. Após a tricotomia realizada na região de calvária do animal, uma incisão linear de aproximadamente 2,5 cm foi feita com um bisturi (Duflex, Brasil) contendo uma lâmina adequada (15 C, BD, Brasil). O tecido em retalho de espessura total foi refletido com um descolador cirúrgico, e posicionado por afastadores e dispositivos em forma de ganchos, acoplados à mesa. Depois de ser feito o acesso à calvária do animal, foram criados dois defeitos ósseos circulares de 5 mm de diâmetro cada, sendo divididos pela sutura sagital média do osso craniano. Inicialmente, foram feitas as duas marcações adjacentes e contralaterais dos limites destes defeitos, por uma broca do tipo trefina de 5 mm de diâmetro (NEODENT, Brasil), acoplada a um contra-ângulo (DABI ATLANTE, Brasil). Esta marcação foi feita com aproximadamente 0,8 mm de profundidade, sem que houvesse acesso à membrana intracraniana (fig. 3), passo muito delicado, pois a espessura do osso da região craniana de ratos não tem média superior a 1,5 mm. Em seguida, a área demarcada foi escavada de forma uniforme por meio do uso de uma broca carbide multilaminada esférica (Antílope, Suíça) de 3 mm de diâmetro em uma peça reta (Kavo, Brasil), acoplada a um motor elétrico portátil em baixa rotação (Dentec - 405N, Brasil) a 900 rpm, com irrigação abundante de solução salina 0,9%, evitando o sobre-aquecimento de tecidos vivos. O procedimento acima

descrito teve como intuito a regularização da superfície do defeito. A irrigação e limpeza do local com gaze estéril (Telamed, Brasil) permitiram uma boa visualização da superfície, mas sempre com a preservação do sangramento proveniente do trabeculado ósseo - isto garante a nutrição sanguínea do enxerto e a formação do coágulo (Bosh, 1998).



Figura 3 – Marcação dos limites dos dois defeitos ósseos com a broca trefina de 5 mm de diâmetro, tendo como limite inferior o sangramento proveniente do trabeculado ósseo.

Para preenchimento dos defeitos criados, com o auxílio de um raspador ósseo do tipo micro-cinzel de tração (Millenium, Brasil), porções de osso autógeno do animal foram extraídas das regiões periféricas ao defeito, com quantidade suficiente a preenchê-lo completamente. No grupo (A), o osso raspado foi imediatamente posicionado sobre o defeito, e levemente condensado com o mesmo instrumento. Nos demais grupos, houve a associação do osso obtido da área doadora com as resinas e a mistura adesiva

órgão. Estes cortes foram obtidos com o uso do micrótomo, como descrito anteriormente.

4.4.1.7 Coloração

No estudo proposto, as lâminas foram coradas por hematoxilina e eosina.

4.4.1.8 Montagem

A montagem foi feita com Bálsamo do Canadá.

4.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.5.1 Análise histológica (parte de biocompatibilidade)

Depois de confeccionadas as lâminas, a análise histológica foi feita por meio de microscopia de luz. Foram avaliadas as partes onde a luz do tubo de polietileno contactava o tecido subcutâneo do animal. Foram feitas análises do tipo de infiltrado inflamatório presente, e contagem de células componentes deste processo, decorrente do contato dos produtos com o tecido subcutâneo.

4.5.2 Análise Histomorfométrica (enxertia óssea)

A análise histomorfométrica das lâminas provenientes da parte de enxertia óssea dos testes, foram feitas com o auxílio do programa ImageTool 3.0. Isto permitiu que a mensuração das dimensões teciduais fosse feita com maior exatidão.

Primeiramente, foram capturadas três imagens de cada uma das lâminas. Duas imagens das extremidades do defeito ósseo (direita e esquerda), e uma foto da parte central do mesmo. Estas fotos foram obtidas em um computador,

4.4.1.3 Redução das Peças (macroscopia)

É o procedimento primeiro, onde as estruturas extraídas serão seccionadas em fatias menores a fim de serem levadas ao fixador, e incluídas em parafina. Tal fato possibilitou que, durante o processo de microtomia, soubéssemos exatamente qual o plano de corte empregado.

No micrótomo os cortes foram feitos de 500 em 500 micrometros. O que se deseja é levar ao Microscópio um preparado no qual os tecidos estejam perfeitamente preservados, apresentando a mesma estrutura e composição química que possuíam quando vivos.

4.4.1.4 Fixação

A fixação dos cortes foi feita com formol, um dos fixadores mais utilizados em histotécnica. A experiência nos mostra que não existe fixador ideal e que todos os fixadores apresentam vantagens e inconvenientes. Nesta pesquisa utilizaremos o formol á 10%.

4.4.1.5 Inclusão

É o procedimento que tem como finalidade impregnar os tecidos com uma substância de consistência firme que permita em etapa posterior cortá-los em fatias finas para depois corá-los, possibilitando assim a sua visualização no microscópio.

4.4.1.6 Microtomia

É esta a etapa mais importante e difícil da técnica histológica e consistiu basicamente em obter cortes sucessivos dos blocos de parafina contendo fragmentos de

(grupos **(A+J)**, **(A+BB)**, **(A+LA)** e **(A+MA)**) (fig. 4). Neste caso o osso foi raspado, transferido para um recipiente cirúrgico (pote Dappin de borracha), e a ele adicionado as resinas a serem analisadas. Estes compostos de enxerto foram levados às cavidades, provendo o completo preenchimento do defeito ósseo (fig 5). No grupo **(C)**, não houve preenchimento da cavidade do defeito com nenhum tipo de enxerto, manteve-se somente o coágulo posicionado.

O fechamento das feridas cirúrgicas foram feitos através de 5 pontos contínuos, utilizando fio de seda 4-0 (Johnsson & Johnsson, Brasil) (Bosch et al., 1998), provendo a íntima coaptação dos bordos, para uma cicatrização por primeira intenção. Os tecidos moles foram reposicionados e suturados com dois pontos descontínuos. O mesmo procedimento será realizado nos lados contralaterais



Figura 4 - Porção de osso autógeno animal, adicionada à Mistura Adesiva.



Figura 5 – Os dois defeitos ósseos preenchidos com osso autógeno associados aos materiais.

4.3 EUTANÁSIA

A eutanásia dos animais, nesta parte do experimento, foi programada para acontecer em 7 e 21 dias (Bosch et al. ,1998), realizada em câmara de gás.

4.4 TÉCNICA HISTOLÓGICA

O método mais comumente usado em histologia é o método que permite a obtenção de preparados histológicos permanentes, as lâminas, para estudo em Microscopia Óptica. A preparação das lâminas usadas neste estudo foram feitas no Laboratório de Histopatologia da Faculdade de

Odontologia da Universidade Positivo.

4.4.1 Obtenção do Material

4.4.1.1 Peças do Dorso

As peças do dorso do animal foram extraídas por meio de uma biópsia excisional das partes circundantes aos tubos de polietileno. Para tal, após nova tricotomia, o tecido cutâneo do animal foi cortado com bisturi (Duflex, Brasil) contendo uma lâmina (15C, BD, Brasil), mantendo-se uma margem de 5 milímetros de tecido ao redor dos tubos. As amostras foram fixadas em uma solução preparada com 10 % de formol, e encaminhadas ao laboratório para o processo de confecção das lâminas para análise histológica.

4.4.1.2 Peças da calvária

A maneira de execução das biópsias dos tecidos onde foram feitas as aplicações dos enxertos, foi de fundamental importância para possibilitar a correta confecção das lâminas que possibilitaram alcançar o objetivo proposto. Sendo assim, os defeitos foram coletados utilizando-se uma peça reta com um disco de carborundum, irrigado com solução salina, acoplada ao motor elétrico, e as amostras fixadas em uma solução preparada com 10 % de formol. Após a fixação, as peças destinadas à microscopia de luz foram lavadas em água corrente e colocadas em tubos de incubação, contendo solução quelante para descalcificação: EDTA (Labsynth, Brasil, 60g/900 ml água destilada), pH 6.4 (ajustado com NaOH sólido, Labsynth, Brasil), a aproximadamente 37°C, em mesa agitadora (WCJ-802, PH CIENTIFICA, Brasil) acoplada ao pHmetro (Onda, Brasil). O tempo de descalcificação foi de aproximadamente 5 dias.